

Composition for treating viral infections, especially caused by retro- or hepatitis viruses, comprises proteosome inhibitor that prevents release, maturation or replication

Veröffentlichungsnummer DE10149398

Veröffentlichungsdatum: 2003-04-24

Erfinder

SCHUBERT ULRICH (DE); WILL HANS (DE); SIRMA HUESEYIN (DE); PRASSOLOW ALEXIJ (DE); SCHUBERT EVELYN (DE) VIROMICS GMBH (DE)

Anmelder:

Klassifikation:

- Internationale:

A61K31/00; A61K31/66; A61K31/336; A61K31/365; A61K31/405; A61K31/407; A61K31/415; A61K31/47; A61K31/5375; A61K31/704, A61K38/55; A61K31/00; A61K31/66; A61K31/336; A61K31/365; A61K31/405; A61K31/407; A61K31/415; A61K31/47; A61K31/5375;

- Europäische:

Anmeldenummer:

Prioritätsnummer(n):

A61K31/00; A61K31/166; A61K31/336; A61K31/365; A61K31/4015; A61K31/407; A61K31/415; A61K31/47; A61K31/5375; DE20011049398 20011003

Daten sind von der [esp@cenet](mailto:esp@cenet.de) Datenbank verfügbar - Worldwide

Report a data error here

Zusammenfassung von DE10149398

■ Composition for treating viral infections contains, as active component, at least one proteosome inhibitor (I).

BEST AVAILABLE COPY



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 101 49 398 A 1

⑯ Int. Cl.⁷:
A 61 K 45/00

DE 101 49 398 A 1

⑯ Aktenzeichen: 101 49 398.3
⑯ Anmeldetag: 3. 10. 2001
⑯ Offenlegungstag: 24. 4. 2003

⑯ Anmelder:
Viromics GmbH, 07749 Jena, DE

⑯ Vertreter:
Wehlau, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
10315 Berlin

⑯ Erfinder:
Schubert, Ulrich, Priv. Doz. Dr., 07407 Uhlstädt, DE;
Will, Hans, Prof. Dr., 22549 Hamburg, DE; Sirma,
Hüseyin, Dr.med., 69168 Wiesloch, DE; Prassolow,
Alexij, Dipl.-Biol., 22529 Hamburg, DE; Schubert,
Evelyn, Dr.rer.nat., 07407 Uhlstädt, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑯ Mittel zur Behandlung von Hepatitis-Virusinfektionen
⑯ Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung, Therapie und Hemmung von Hepatitis-Virusinfektionen und der damit im Zusammenhang stehenden Hepatopathogenese und Erkrankungen. Die zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitisviren eingesetzten Mittel in pharmazeutischen Zubereitungen enthalten als wirksame Komponente Substanzklassen, denen gemeinsam ist, dass sie das 26S Proteasom in Zellen inhibieren. Dazu gehören vor allem Proteasom-Inhibitoren, welche die Aktivitäten des Ubiquitin/Proteasom-Pathway beeinflussen, insbesondere die enzymatischen Aktivitäten des 26S und des 20S Proteasom-Komplexes. Die Anwendung der Erfindung liegt in der anti-viralen Therapie von Hepatitis-Infektionen, speziell in der Verhinderung der Etablierung sowie der Aufrechterhaltung einer akuten und chronischen HBV- und HCV-Infektion und damit assoziierter Leberkarzinome.

DE 101 49 398 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung, Therapie und Hemmung einer Virushepatitis. Die Anwendung dieser Mittel in pharmazeutischen Zubereitungen führt vorwiegend oder ausschließlich zur Freisetzung von nicht infektiösen Hepatitis-Viren aus infizierten Zellen, welche nicht mehr in der Lage sind, die durch Leberzellregeneration neu entstehenden Hepatozyten produktiv zu infizieren. Die gleichen Mittel können die Ausbreitung einer akuten Infektion begrenzen, da alle Nachkommenviren, produziert unter Behandlung mit diesen Mitteln, nicht oder so gut wie nicht infektiös sind. Des weiteren sind die Mittel für nicht proliferierende Hepatozyten weniger toxisch als für Non-Parenchymzellen der Leber und Leberkarzinomzellen. Damit sind diese Mittel für eine bevorzugte Zerstörung von Leberkarzinomzellen in HBV- (Hepatitis-B-Viren, Abkürzungsverzeichnis hinter den Beispielen) und HCV (Hepatitis-C-Viren)-infizierten Patienten und Tieren geeignet. Bei den Mitteln handelt es sich um verschiedene Substanzklassen, welchen gemeinsam ist, dass sie das 26S Proteasom in Zellen inhibieren. Am Beispiel des Enten-Hepatitis-B-Virus (DHBV) wird gezeigt, dass diese Mittel, die Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von infektiösen Hepatitis-Viren aus bereits infizierten Hepatozyten drastisch reduzieren. Anwendungsbeispiele für diese Erfindung sind die anti-virale Therapie von Hepatitis-Infektionen, speziell zur Verhinderung der Etablierung sowie der Aufrechterhaltung einer akuten und chronischen HBV- und HCV-Infektion. Konkret kann mit Proteasom-Inhibitoren die Virämie sowohl bei einer Neuinfektion als auch bei chronischen Infektionen unterdrückt und der Erfolg einer Viruseliminierung durch das eigene Immunsystem und/oder durch bekannte Mittel mit ähnlicher oder anderer Wirkung erhöht werden. Die Folgen einer HBV- und HCV-Infektion – wie z. B. Leberschädigungen unterschiedlichen Schweregrades bis hin zur häufig tödlich verlaufenden fulminanten Hepatitis, Entwicklung einer Leberzirrhose/Fibrose oder eines Leberkarzinoms – können durch den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren verhindert, gemindert oder revertiert werden.

Charakteristik des bekannten Standes

0. Einleitung

[0002] Die Infektion mit Hepatitis-B-Viren (ca. 5% der Weltbevölkerung sind betroffen) und Hepatitis-C-Viren (ca. 3% der Weltbevölkerung sind betroffen) gehört zu den großen Weltgesundheitsproblemen. Beide Infektionen haben häufig einen chronischen Virus-Trägerstatus zur Folge. Zu den Krankheitssymptomen der Infektionen gehören Leberentzündungen verschiedener Schweregrade bis hin zum Leberversagen (fulminante Hepatitis), ein erhöhtes Risiko der Entwicklung einer Leberzirrhose und Fibrose sowie die Entstehung von Leberkarzinomen. Neuinfektionen mit HBV können relativ effizient, aber wegen der Existenz von Impfversagern und Immunescape-Varianten nicht komplett, durch eine prophylaktische Immunisierung verhindert werden. Für eine HCV-Neuinfektion gibt es bisher keinen Impfschutz. Trotz der Vielzahl von Medikamenten für die Therapie einer chronischen HCV- und HBV-Infektion, die alle mit Nebenwirkungen belastet sind und im wesentlichen aus Zytokinen (Interferon alpha und Varianten hiervon) sowie Nukleosidanalogika bestehen, ist es bisher nicht möglich, die Mehrzahl der chronischen Träger von HBV und HCV zufriedenstellend zu therapieren, da entweder die Patienten nicht ansprechen auf die Medikamente oder nur kurzzeitige Besserung eintritt und in der Regel das Virus durch die Be-

handlung nicht vollständig eliminiert werden kann. Auch die passive Gabe von HBV-spezifischen neutralisierenden Antikörpern und/oder Nukleosidanalogika oder anderen Medikamenten bei Lebertransplantierten verhindert in der Regel nicht die Neuinfektion der transplantierten Leber. Immunsuppression von Patienten mit abklingenden Hepatitiden kann zur Reaktivierung von latent vorhandenen Viren führen. Das Hauptproblem bei Nukleosidanalogika ist die hohe Mutationsrate sowohl von HBV als auch von HCV, wodurch sich Medikamenten-resistente Virusstämme während der Behandlung entwickeln. Um die Probleme der bisher verfügbaren antiviralen und therapeutischen Mittel für die Hepatitis B und C zu umgehen, sind neue Therapieansätze notwendig, welche konservierte zelluläre Faktoren beeinflussen, die für die Vermehrung dieser Viren in der Wirtszelle essentiell sind. Solche Mittel werden in dieser Erfindung beschrieben. Und zwar betrifft dies die überraschende Erkenntnis, dass Inhibitoren der hauptsächlich zellulären Protease, das ist das 26S Proteasom, die Produktion von infektiösen Hepatitisviren verhindern und dabei gleichzeitig das Absterben von Lebertumorzellen induzieren. Die Mittel sind wegen der Möglichkeit, diese bevorzugt in die Leber zu transportieren, besonders für die selektive Therapie von viralen Lebererkrankungen und Leberkarzinomen geeignet.

25
1. Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems

[0003] Proteasomen sind multikatalytische und multi-Subunit Enzymkomplexe, die ca. 1% des Gesamt-Zellproteins darstellen und als die hauptsächliche proteolytische Komponente im Zellkern und Zytosol aller eukaryontischen Zellen vorkommen. Proteasomen üben eine vitale Rolle in vielfältigen Funktionen des Zellmetabolismus aus. Die hauptsächliche Funktion von Proteasomen ist die Proteolyse von missgefalteten, nicht-funktionellen oder für den schnellen Abbau bestimmten, in der Regel regulatorischen Proteinen. Eine weitere Funktion des proteasomalen Abbaus einer Vielzahl von zellulären oder viralen Proteinen ist die Generierung von Peptidliganden für Major Histocompatibilitäts (MHC) Klasse-I-Moleküle, welche für die T-Zell-vermittelte Immunantwort notwendig ist (Rock und Goldberg, 1999).

[0004] Proteasom-Targets werden in der Regel für den proteasomalen Abbau durch die Anheftung von oligomeren 45 Formen von Ubiquitin (Ub) markiert. Ub ist ein hochkonserviertes, 76 Aminosäuren langes Protein, das kovalent an Targetproteine via Isopeptidbindung zwischen dem COOH-Terminus und der ε-NH₂-Gruppe von Lysin-Seitenketten gekoppelt wird, entweder am Targetprotein oder an Ub-Moleküle selber, die bereits an das Targetprotein geheftet sind. Das Ergebnis der Konjugation von Ub-Molekülen ist die Formierung von sogenannten poly-Ub-Ketten. Allgemein sind Multimere von vier Ub-Molekülen notwendig, um als Signal für die proteasomale Degradation zu fungieren. Die 50 Ubiquitinierung selbst ist reversibel, und Ub-Moleküle können durch eine Vielzahl von Ub-Hydrolasen von dem Targetmolekül wieder entfernt werden. Die Verbindung zwischen der Ubiquitinierung von Targetproteinen und der proteasomalen Protopolyse wird allgemein als Ub-Proteasom-System (UPS) bezeichnet (für Review siehe Hersko und Chienanover, 1998; Baumeister et al., 1998).

[0005] Das 26S Proteasom ist ein 2.5 Megadalton (MDa) großer Multienzym-Komplex, welcher aus ca. 31 Untereinheiten besteht (für Review siehe Voges et al., 1999). Die proteolytische Aktivität des Proteasom-Komplexes wird durch eine zylinderförmige 700 Kilodalton (kDa) große und aus vier übereinander liegenden Ringen bestehende Core-Struktur, dem 20S Proteasom, realisiert. Das 20S Proteasom

bildet einen aus 14 nicht identischen Proteinen (im Molekulargewichtsbereich von 21 bis 31 kDa) bestehenden komplizierten Multienzymkomplex, der in zwei α - und zwei β -Ringen in einer $\alpha\beta\alpha$ -Reihenfolge angeordnet ist. Die Substratspezifität des 20S Proteasom umfasst drei wesentliche proteolytische Aktivitäten: Trypsin-, Chymotrypsin- und Post-glutamyl-Peptidhydrolyserende- (PGPH), oder auch Kaspase-ähnliche Aktivitäten, welche in den β -Untereinheiten Z, Y und Z lokalisiert sind. Das 20S Proteasom degradiert in vitro denaturierte Proteine unabhängig von deren Poly-Ubiquitinierung. Dagegen werden in vivo enzymatische Aktivitäten des 20S Proteasoms durch Anlagerung der 19S regulatorischen Untereinheiten reguliert, welche zusammen das aktive 26S Proteasom-Partikel bilden. Die 19S regulatorischen Untereinheiten sind bei der Erkennung von poly-ubiquitiinierten Proteinen sowie bei der Entfaltung von Targetproteinen beteiligt. Die Aktivität des 26S Proteasom ist ATP-abhängig und degradiert fast ausschließlich nur poly-ubiquitiinierte Proteine. Die katalytisch aktiven β -Untereinheiten des 20S-Proteasoms (X, Y und Z) können durch γ -Interferon induzierbare MHC-kodierte Untereinheiten ausgetauscht werden, die dann das sogenannte "Immuno-Proteasom" bilden (Gaczynska et al., 1994).

1.1. Bedeutung des UPS in der Pathogenese klinisch relevanter Krankheiten

[0006] Die Spezifität, mit der Proteasomen bestimmte Proteine abbauen, hängt wesentlich von der Ubiquitinierung des Targetproteins ab. Diese wiederum wird durch die Aktivität einer Vielzahl von Ubiquitin-Ligasen und Ubiquitin-Hydrolasen reguliert. Die enge Verknüpfung des UPS mit zellulären Mechanismen erklärt die Bedeutung dieses Systems für zahlreiche pathologische Mechanismen, von denen bislang nur ein geringer Teil bekannt ist (für Review siehe Schwartz und Ciechanover, 1999).

[0007] Eine wichtige Rolle in der Entstehung von malignen Tumoren spielt das Tumorsuppressor-Protein p53. Beispielsweise ist der Level an p53 in besonders aggressiven Formen von zervikalen Karzinomen extrem niedrig, die durch bestimmte Hochrisiko-Isolate des humanen Papillomavirus (HPV) ausgelöst werden. Das HPV onco-Protein E6 induziert den Abbau des Suppressorproteins p53 via den Ubiquitin-Proteasom-Pathway.

[0008] Bei der Entstehung von colorektalem Cancer spielt β -Catenin, ein via dem UPS regulierter zellulärer Faktor, eine wichtige Rolle in der Signal-Transduktion und Differenzierung von colorektalem Epithelium. Auch ist eine Rolle des UPS bei Erbkrankheiten bekannt, zum Beispiel für den Pathomechanismus von Cystischer Fibrosis (proteasomaler Abbau des Transmembran-Regulators CFTR), dem Angelmans-Syndrom (Funktion der Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP) sowie dem Liddle-Syndrom (Ubiquitinierung und lysosomale Degradation des Amiloridsensitiven Epithelium Natrium-Ionenkanals) (für Review siehe Ciechanover et al., 2000; Schwartz und Ciechanover, 1999).

[0009] Ebenfalls spielt das UPS bei neurodegenerativen Erkrankungen eine entscheidende Rolle: Die Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten wurde in pathologischen Läsionen bei Alzheimer und Parkinson berichtet. Bei Huntington akkumulieren die Proteine Huntington und Ataxin in Proteasom-aktiven nukleären Strukturen im Zellkern.

[0010] Eine zentrale Funktion übt das UPS bei Erkrankungen des Immunsystems aus. Zum einen ist der 26S Proteasom-Komplex die hauptsächliche Protease in der MHC-I-Antigenprozessierung, und zum anderen kann die Aktivität des Proteasoms selbst sowohl durch γ -Interferon induzierbare katalytische β -Untereinheiten als auch durch die regu-

latorische Untereinheit PA28 manipuliert werden. Viele entzündliche und immunologische Krankheiten stehen im Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher verschiedene Gen-Funktionen in der Immunantwort reguliert. Die Aktivierung von NF- κ B, die durch Ubiquitinierung und spezifische Spaltung eines Vorläuferproteins durch das Proteasom gesteuert wird, führt zur erhöhten Expression von verschiedenen Zytokinen, Adhäsiomsmolekülen, entzündlichen und Stress-Response-Proteinen sowie Immunrezeptoren (für Review siehe Ciechanover et al., 2000; Schwartz und Ciechanover, 1999).

1.2. Proteasom-Inhibitoren

[0011] Verschiedene Substanzklassen sind als Proteasom-Inhibitoren bekannt. Es sind zum einen chemisch modifizierte Peptidaldehyde wie Tripeptidaldehyd N-carbobenzoxy-L-leucinyl-L-leucinyl-L-leucinal (zLLL), das auch als MG132 bezeichnet wird, sowie das um den Faktor 10 wirksamere Borsäure-Derivat MG232. Das zLLL und davon abgeleitete Derivate blockieren das Proteasom reversibel durch Ausbildung einer transienten Hemiacetal-Struktur mit der katalytisch aktiven Threonin-Hydroxyl-Seitenkette in Position 1 der β -Untereinheit des 26S Proteasoms (Coux et al., 1996; Rock et al., 1994). Ähnlich zu zLLL wurde eine weitere Klasse von modifizierten Peptiden als Peptid-Vinyl-Sulfone beschrieben (Bogyo et al., 1997).

[0012] Natürlich vorkommende Substanzen, isoliert aus Mikroorganismen, sind Lactacystin (LC) (Fenteany et al., 1995) aus Streptomyzeten sowie Epoxomicin aus Aktinomyzeten (Meng et al., 1999a, b). LC ist ein hoch spezifischer und wirksamer Proteasom-Inhibitor, welcher das Proteasom durch Transesterifizierung und Alkylierung der Threonin-Seitenkette in der β -Untereinheit irreversibel inaktiviert (Fenteany et al., 1995). LC ist daher ein irreversibler, kovalent wirkender Proteasom-Inhibitor, welcher hauptsächlich die Chymotrypsin und die Trypsinähnlichen Aktivitäten des 26S Proteasoms blockiert (Fenteany et al., 1995). LC hat keine Peptid-Grundstruktur, sondern besteht aus einem γ -Lactam-Ring, einem Cystein und einer Hydroxy-butyl-Gruppe. LC selbst inhibiert nicht das Proteasom. Vielmehr wird in wässriger Lösung der N-Acetyl-Cystein-Rest hydrolysiert. Das Resultat ist die Bildung eines Clastolactacystein β -Lactons. Diese Lacton-Struktur ist in der Lage, Zellmembranen zu penetrieren. Nach Zellaufnahme kommt es zum nukleophilen Angriff des β -Lacton-Rings und anschließender Transesterifizierung der Threonin-Hydroxyl-Gruppe der β -Untereinheit (für Review siehe Grötlipp und Schmidtke, 1999).

[0013] Ein weiterer Proteasom-Inhibitor ist das natürlich vorkommende Epoxyketon Epoxomicin. Hinsichtlich der Spezifität für das 26S Proteasom und Wirksamkeit ist Epoxomicin der bislang wirksamste von allen bekannten natürlich vorkommenden (Meng et al., 1999a und 1999b). Weiterhin zeichnet sich Epoxomicin durch eine vergleichsweise geringe Toxizität in Zellkulturen aus (Hanada et al., 1992; Sugawara et al., 1990).

[0014] Eine weitere und sehr potente Klasse an synthetischen sind Borsäure-Peptid-Derivate, insbesondere die Verbindung Pyranoyl-Phenyl-Leuzinyl-Borsäure mit dem Namen "PS-341". PS-341 ist sehr stabil unter physiologischen Bedingungen und ist bioverfügbar nach intravenöser Applikation (Adams und Stein, 1996). Borsäure-Peptid-Derivate sind allgemein bekannt als Inhibitoren verschiedenster eukaryotischer Proteasen, wie zum Beispiel Thrombin, Elastase, Dipeptidylprotease IV (zusammengefasst in Adams und Stein, 1996). Die besondere Wirksamkeit von PS-341 als Proteasom-Inhibitor wird vermutlich durch die sehr sta-

bile Bindung zwischen Borsäure- und Hydroxyl-Gruppe der katalytisch aktiven Seitenkette von Thr1 in der aktiven β -Untereinheit des 20S-Proteasoms (inhibitorische Konstante, $K_i = 0.6 \text{ nM}$) realisiert (Adams und Stein, 1996). Außer dem Proteasom ist bislang keine zelluläre Protease bekannt, welche durch PS-341 beeinflusst wird. Verschiedene Borsäure-Peptid-Derivate wurden auf ihre Wirkung als Proteasom-Inhibitor bereits getestet (Adams et al., 1998). Dabei wurde festgestellt, dass Leucin bevorzugt in P1-Position, und relativ große hydrophobe Seitenketten, wie zum Beispiel Naphthylalanin, in P2 und P3 die Wirksamkeit und den K_i -Wert des Inhibitoren verbessern (Adams et al., 1998). Die Wirkung von Peptid-Borsäure-Derivaten auf Serin-Proteasen ist bereits bekannt und wird vermutlich durch das freie p-Orbital von Bor begründet, welches das freie Elektronenpaar des Sauerstoffs im Serin im aktiven Zentrum binden kann.

[0015] Andere, zu PS-341 ähnliche Borsäure-Peptid-Derivate wurden als Proteasom-Inhibitor beschrieben, wie zum Beispiel Benzoyl-Phenylalanin-Borsäure-Leucin (Gardner et al., 2000). Ebenfalls wurde ein stark potenter Proteasom-Inhibitor mit der Bezeichnung "PS-273" (Morpholin-COHN-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) beschrieben, welcher eine ähnliche Grundstruktur wie PS-341, jedoch N-terminal eine Morpholin-Stuktur aufweist, dadurch hydrophober ist und vermutlich somit leichter Membranen penetrieren kann als PS-341 (Adams et al., 1999).

1.2.1. Klinische Applikation von Proteasom-Inhibitoren

[0016] Der 26S Proteasom-Komplex als die hauptsächliche zelluläre Protease ist für vielfältige Zellprozesse von wesentlicher Bedeutung. Die Hemmung der Proteasom-Aktivität kann daher zu Veränderungen in der Regulation des Zellzyklus (Schwartz und Chiechanover, 1999), der Transkription (Palombella et al., 1994), der gesamten zellulären Proteolyse (Rock et al., 1994), sowie der MHC-I Antigenpräzessierung (Pamer und Cresswell, 1998) führen. Vollständige Inhibierung der Proteasom-Aktivität führt allgemein zu Zellzyklusarrest und Zelltod. Der Proteasom-Komplex übt somit essentielle Zellfunktionen aus und ist für die Zellvitalität unverzichtbar. Eine dauerhafte Inhibierung aller enzymatischen Aktivitäten des Proteasoms ist mit dem Leben einer Zelle und somit des Gesamtorganismus nicht einbar.

[0017] Es zeigt sich jedoch, dass neuartige reversibel wirkende Proteasom-Inhibitoren selektiv einzelne proteolytische Aktivitäten des 26S Proteasoms inhibieren, ohne dabei andere zelluläre Proteasen zu beeinflussen. Die Zytotoxizität solcher Inhibitoren ist daher wesentlich geringer im Vergleich zu den relativ unspezifisch wirkenden Peptidaldehyden wie zum Beispiel zLLL. Diese Tatsache erlaubt sowohl die in vivo Anwendung solcher neuartigen (Meng et al., 1999a und 1999b) als auch die Etablierung von permanenten Zelllinien, welche relativ hohe Konzentrationen an tolerieren (Glas et al., 1998; Geier et al., 1999).

[0018] Der Anspruch, dass bestimmte Proteasom-Inhibitoren in einem bestimmten Dosis-Regime in vivo verträglich sein können, wurde mehrfach gezeigt. Beispielsweise wurde die Selektion von Maus-Thymus-Zelllinien beschrieben, welche die ständige Anwesenheit von 10 microM des Proteasom-Inhibitors z-Leuzinyl-Leuzinyl-Leuzinylvinylsulfon (NLVS) tolerieren und dabei normales Zellwachstum und Zellmetabolismus mit gleichzeitig eingeschränkter MHC-I-Antigenpräsentation besitzen (Bogyo et al., 1997; Glas et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem sehr potennten Proteasom-Inhibitor LC erzielt, der bis zu 6 microM in Zellkulturen toleriert wurde (Geier et al., 1999).

[0019] Epoxomicin, ein Epoxy- β -aminoketon modifiziertes Peptid, wurde als eine völlig neuartige Klasse von Proteasom-Inhibitoren aus Actinomyceten isoliert (Hanada et al., 1992; Sugawara et al., 1990). Epoxomicin besitzt eine starke zytotoxische Wirkung gegen verschiedene in vitro kultivierte Tumorzelllinien und zeigte im Maus-Modell in vivo inhibitorische Aktivität gegen Melanom- und Leukämie-Modelltumore (Hanada et al., 1992). Erstaunlicherweise wurde in diesen in vivo Studien Epoxomicin und ein 10 Derivat davon, Eponemycin, in einer relativ hohen Dosis von 1.0 mg/kg Körpergewicht/Tag toleriert (Hanada et al., 1992).

[0020] Die Bedeutung von Proteasom-Inhibitoren als ein neues therapeutisches Prinzip hat in den vergangenen Jahren 15 eine zunehmende Aufmerksamkeit erfahren, insbesondere bei Behandlung von Krebs und entzündlichen Erkrankungen (für Review siehe Rivett und Gardner, 2000). Bislang ist der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren für die breite klinische Anwendung am Menschen noch nicht zugelassen. Es möhren sich jedoch Berichte in der Fachliteratur, dass in jüngster Zeit die pharmazeutische Industrie intensiv an der Entwicklung von neuen Medikamenten auf der Basis von in vivo verträglichen Proteasom-Inhibitoren arbeitet. Einige Beispiel seien hierzu angeführt: Die Firma "Millennium Pharmaceuticals Inc." (Cambridge, MA 02139, USA) arbeitet nach Übernahme der Firma "ProScript Inc." an der Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren für entzündungshemmende, immunmodulatorische und anti-neoplastische Therapien, dabei insbesondere an Borsäure-Derivaten von DiPeptiden, insbesondere PS-341 (Gardner et al., 2000). Die orale Applikation von PS-341 hat im Ratten-Modell eine entzündungshemmende Wirkung in Streptokokken-induzierter Polyarthritis und Leber-Entzündung (Palombella et al., 1998). Im Maus-Modell zeigt PS-341 anti-neoplastische 25 Wirkung gegen Lungenkarzinom und hat außerdem eine additive Wirkung in Verbindung mit Zytostatika (Teicher et al., 1999). In vitro Versuche demonstrieren eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber soliden humanen Ovarien- und Prostata-Tumorzellen (Frankel et al., 2000). Phase I klinische 30 Studien an PS-341 demonstrieren eine gute Bio-Fähigkeit und pharmakokinetisches Verhalten (Lightcap et al., 2000). PS-341 ist der bislang einzige klinische erprobte Proteasom-Inhibitor. Dazu wurden Phase I und Phase II klinische Studien in Patienten mit unterschiedlichen Krebsarten, 35 wie zum Beispiel hämatologischen Malignanzen als soliden Tumoren bereits abgeschlossen. Die Informationen dazu wurden in verschiedenen Pressemitteilungen von Millennium Inc. vorgestellt:

50 – Zum Beispiel wurden Ergebnisse über Phase II klinische Studien in Multiple Myelom-Patienten berichtet (Presse-Mitteilung von Millennium von 01.03.01: "Millennium Initiates Phase II Clinical Trials of LDP-341 in Multiple Myeloma." Publiziert auf Webseite <http://biz.yahoo.com/prnews/010301/neth003.html>).

55 – Erste vorläufige Studien über die Wirkung des Proteasom-Inhibitors PS-341 als (take off Seitenumbroch) neue anti-Krebsbehandlung in Myelom-Patienten wurden auf dem 42. Meeting der Amerikanischen HämatoLOGischen Gesellschaft, Dezember 2000, San Francisco, CA, USA, vorgestellt (Presse-Mitteilung von Millennium von 04.12.00: Millennium's LDP(PS)-341 inhibits growth and induces death of cancer cells, appears to overcome chemotherapy resistance. Publiziert auf Webseite <http://biz.yahoo.com/prnews/010301/neth003.html>).

60 – Auf dem Meeting der Amerikanischen Gesellschaft für Klinische Onkologie, im Mai 2000, wurden Daten

über Phase I klinische Studien mit PS-341 in Patienten mit fortgeschrittenen malignen Tumoren (einschließlich Melanoma, Nierenkarzinom, Lungenkarzinom, Prostata-Krebs, Ovarien-Krebs, Blasen-Krebs, Cervix-Krebs, Endometrialen und Gaflen-Tumoren) vorgestellt. Es wurde keine Dosis-limitierende Toxizität durch die Behandlung mit PS-341 beobachtet. Aufgrund der erstaunlichen Wirkung von PS-341 in Bezug auf anti-neoplastische Wirkung und Induktion von Apoptose konnten therapeutische Effekte in verschiedenen Tumor-Patienten beobachtet werden (Presse-Mitteilung von Millennium vom 23.05.00: "Millennium presents clinical trial data on LDP-341 for advanced malignancies." Publiziert auf Webseite http://www.mlnm.com/releases.pr052300_1.shtml).

– Weitere Informationen über das klinische Protokoll von Phase I Studien in Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren (solide Tumore als auch Lymphoma), welche auf Standard-Chemotherapie nicht mehr angesprochen haben, wurden im "CancerNet"online publiziert ("Phase I study of PS-341 in patients with advanced solid tumors or lymphomas". Publiziert am 11.09.00 auf Webseite <http://cancernet.nci.nih.gov/>).

– Ergebnisse über Phase I klinische Studien mit PS-341 in Patienten mit akuter Leukämie, Myelodysplastischem Syndrom und chronischer Myelidener Leukämie wurden berichtet, dabei insbesondere die synergistische Wirkung von PS-341 mit Standard Chemotherapeutika (Presse-Mitteilung vom 09.11.00: "Phase I study of PS-341 in acute leukemias, myelodysplastic syndromes and chronic myeloid leukemia in blast phase." Publiziert online in Leukemia Insights Newsletter, auf Webseite <http://www3.manderon.org/leukemia/insight/letter52.html>).

[0021] Eine weitere klinische Anwendung von Proteasom-Inhibitoren, insbesondere solcher, die von der Firma Millennium Pharmaceuticals Inc. entwickelt wurden, deutet sich bei entzündlichen und Auto-Immunerkrankungen an. Schmerzen, Schwellungen und Gewebezerstörung sind Erscheinungen verbunden mit entzündlichen, inflammatorischen Prozessen. Diese werden allgemein ausgelöst durch eine Kaskade von Zytokin- und Chemokin-Produktion sowie der Expression von bestimmten Zelladhäsionsmolekülen (für Review siehe Barnes und Karin, 1997). Eine zentrale Stellung in der Regulation dieser Prozesse nimmt der Transkriptionsfaktor NF- κ B ein. Dieser ist notwendig für die Expression einer Reihe von pro-inflammatorischen Faktoren. NF- κ B, als ein Vertreter der Rel-Proteine, besteht aus einem Heterodimer von p50 und p65 Untereinheiten (für Review siehe Baldwin, 1996). In ruhenden Zellen ist NF- κ B im Zytosol lokalisiert und zwar in einer latenten, inaktiven Form, garantiert durch die Bindung an den inhibitorischen Faktor IKB. Dieser maskiert das nukleäre Lokalisationssignal im p50/p65 Heterodimer. Signale der Zellaktivierung, zum Beispiel Zytokine oder virale Infektionen lösen die Phosphorylierung und poly-Ubiquitinierung von IKB und damit die Aktivierung von NF- κ B aus (für Review siehe Thanos und Maniatis, 1995). Nach Aktivierung von NF- κ B kommt es zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern, wo NF- κ B die Transkription von verschiedenen Genen, vor allem die von Zytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen stimuliert. Diese Faktoren sind in der Summe involviert in der Regulation von Immun- und inflammatorischen Prozessen. Durch Proteasom-Inhibitoren kann der Abbau von IKB und somit die Aktivierung von NF- κ B blockiert werden. Darauf beruht die entzündungshemmende Wirkung einer Reihe von Proteasom-Inhibitoren.

[0022] In einem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass der Proteasom-Inhibitor PS-519 (ein β -Lacton-Derivat) eine starke anti-inflammatoryische Wirkung ausübt, und zwar in beiden, der verzögerten als auch der über-sensitiven Entzündungsreaktion. In niedrigen Dosen ist PS-519 auch wirksam in Kombination mit Steroiden. PS-519 wurde daher als ein neues Medikament für die Asthma-Behandlung vorgeschlagen (Elliott et al., 1999). Eine weitere Anwendung für PS-519 ergibt sich im Infarkt-Modell: Die inflammatoryische Reaktion nach zerebralen Verletzungen wurde durch PS-519 dramatisch reduziert. Danach scheint PS-519 ebenfalls ein interessantes Pharmakon für die Behandlung von Gehirnschlag zu sein (Phillips et al., 2000).

[0023] Da Proteasom-Inhibitoren einen essentiellen Pathway im Zellmetabolismus treffen, ist ein strenges Dosis-Regime notwendig, um toxische Neben-Effekte zu unterdrücken. Im Rahmen der Entwicklung von in vivo verträglichen Proteasom-Inhibitoren wurden verschiedene Peptid-Borsäure-Derivate getestet, welche sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell anti-Tumor-Wirkung zeigten (Adams et al., 1998; 1999). In vitro besitzt PS-341 eine selektive zytotoxische Aktivität gegen ein breites Spektrum an humanen Tumorzelllinien (Adams et al., 1999). Diese Aktivität ist mit der Akkumulation von p21 und Zellzyklus-Arrest in der G2-M-Phase mit nachfolgender Apoptose verbunden (Adams et al., 1999). Direkte Injektion von PS-341 bewirkte das Absterben von 70% der untersuchten Tumoren im Maus-Modell. Nach intravenöser Verabreichung von PS-341 verteilte sich die Substanz in allen Organen und Geweben und hatte anti-neoplastische Aktivität in human-Xenograft-Modellen (Adams et al., 1999).

1.2.2. Applikation von Proteasom-Inhibitoren in der anti-retroviralen Therapie

[0024] Der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren mit dem Ziel, virale Infektionen zu blockieren, wurden bislang nur für HIV-Infektionen beschrieben. Insbesondere wurde von Schubert et al. (2000a) gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren die Assemblierung, Freisetzung und proteolytische Reifung von HIV-1 und HIV-2 blockieren. Dieser Effekt beruht auf einer spezifischen Blockade der proteolytischen Prozessierung der Gag Polyproteine durch die HIV-Protease, ohne dass Proteasom-Inhibitoren die enzymatische Aktivität der viralen Protease selbst beeinflussen (Schubert et al., 2000a). Als Mechanismus wurde daher vorgeschlagen, dass Proteasom-Inhibitoren die Akkumulation von falsch gefalteten Gag-Molekülen bewirken, welche normalerweise durch das UPS in Form von "defective ribosomal products, DRIPs" abgebaut werden (Schubert et al., 2000b). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von Proteasom-Inhibitoren die mono-Ubiquitinierung der "Late assembly"-Domäne in Gag gestört ist (Ott et al., 2000).

[0025] Weitere Zusammenhänge zwischen Ubiquitin/Proteasom-Pathway wurden für Budding von Rous Sarcoma Virus, RSV (Patnaik et al., 2000); Simian Immunodeficiency Virus, SIV (Strack et al., 2000), und Ebola Virus (Harty et al., 2000) berichtet. Der Mechanismus, mit welchem Proteasomen die Assemblierung verschiedener Viren regulieren, ist bislang unverstanden.

[0026] Im Wesen der Erfindung kann somit zusammengefasst festgestellt werden, dass die überraschenderweise festgestellte anti-virale Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf Hepadnaviren (HBV, HCV) bislang noch nicht beschrieben wurde. Insbesondere wurden keinerlei anti-virale Effekte durch Proteasom-Inhibitoren auf die Prozesse des HBV-Replikationszyklus ermittelt. Es wurde nicht beschrieben, dass Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von infektiösen

HBV-Virionen der Virus-Produzent-Zellen blockieren. Weiterhin wurde nicht berichtet, dass Proteasom-Inhibitoren bevorzugt durch Hepatitis-Infektionen hervorgerufene Leberkarzinomzellen abtöten und dadurch für die Therapie von Leberkarzinomen geeignet sind. Die erfindungsgemäß dargestellten Wirkungen von Proteasom-Inhibitoren auf frühe und späte Prozesse der HBV-Replikation wie auch der Entwicklung von sekundärer Leberzirrhose und Leberkarzinomen stellen somit völlig neuartige Prinzipien der anti-viralen Behandlung von HBV-Infektionen dar.

1.3. Verbindung zwischen dem UPS und dem Replikationszyklus von Hepadnaviren

[0027] In keiner bekannten Studie wurde bisher analysiert, welchen Einfluss Proteasom-Inhibitoren auf die Freisetzung und Infektiosität von HBV haben. Proteasom-Inhibitoren wurden bisher lediglich im Zusammenhang mit Hepatitis-Viren eingesetzt, um die Interaktion von einzelnen viralen Proteinen mit dem Proteasom und die Rolle der Proteasom-Aktivität für die MHC-vermittelte Presentation und Degradation von viralen Peptiden zu untersuchen.

1.3.1 Funktion des UPS in der Replikation von HBV

[0028] Für eines der regulatorischen Proteine von HBV, das HBx Protein, wurde gezeigt, dass es mit der Untereinheit XAPC7 (auch PSMA7 genannt) des 26S Proteasom-Komplexes interagiert. Für diese Untereinheit wurde gezeigt, dass sie direkt an HBx bindet und dies für die Funktion von HBx essentiell ist. Durch Inhibition der Expression von XAPC7 durch Antisense Oligonukleotide konnte die Transaktivierungsaktivität von HBx blockiert werden (Hu et al., 1999). Die Wechselwirkung von einer weiteren Proteasom-Untereinheit mit HBx wurde ebenfalls beschrieben (Zhang et al., 2000). Wesentlich unter den bereits bekannten Studien ist die Beobachtung, dass die Präsentation von HBV und HCV antigenen Determinanten in Form von MHC Klasse I Peptid-Komplexen offensichtlich auch in Gegenwart von Proteasom-Inhibitoren effizient erfolgen kann (Lopez et al., 2000). Die Erkennung von HBV infizierten Leberzellen durch zytotoxische T_{CD8+}-Zellen und damit die zelluläre natürliche Immunität gegen eine HBV-Infektion wäre somit durch eine Therapie mit Proteasom-Inhibitoren nicht beeinflusst wie dies in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung vorgeschlagen wird.

[0029] Zusammengefasst kann festgestellt werden: In keiner dieser Studien oder anderen bislang publizierten Arbeiten getestet oder berichtet wurde, dass Proteasom-Inhibitoren einen Einfluss auf die Freisetzung und Infektiosität von Hepatitis-Viren haben, wie dies überraschenderweise in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung beobachtet und dargestellt wurde.

1.3.2 Funktion des Ubiquitin/Proteasom-Pathway in der Replikation von HCV

[0030] Die Expression von HCV-Proteinen beeinflusst nicht wie bei HBV die Aktivität des UPS (Moradpour et al., 2001). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die MHC-Klasse I Antigenpräsentation und die Prozessierung von viralen Antigenen von HCV nicht beeinflusst werden und somit andere Immunescape-Mechanismen für die Etablierung einer persistenten HCV notwendig sind. Eine Fraktion des HCV core Proteins selbst wird via dem UPS abgebaut (Suzuki et al., 2001). Es tritt auch eine mono-ubiquitinisierte Form des core-Proteins auf, die jedoch stabil ist und nicht abgebaut wird.

1.3.3 Funktion des UPS in der Replikation von HCC

[0031] Bisher wurde nicht getestet, ob Proteasom-Inhibitoren einen Einfluss auf die Proliferation oder den Transformationstatus von hepatzellulären Karzinomen (HCC) haben. Lediglich bekannt ist, dass die P28 Proteasom-Untereinheit in den meisten HCCs überexprimiert wird (Higashitsuji et al., 2000).

10 2. Biologie von Hepatitis-Viren

2.1. Humane und Animale Hepatitis-B-Viren

[0032] Es sind eine Vielzahl von human Hepatitis B Virus (HBV) verwandten Tierviren bekannt, die zusammen die Familie der sogenannten Hepadnaviren bilden (Ganem, 1996; Schäfer et al., 1998). Gemeinsam ist diesen Viren die Synthese einer pregenomischen RNA von einer zirkulären supergecoilten Form des Genomes (cccDNA) im Zellkern, Verpackung einer prägenomischen RNA im Zytoplasma in Nukleokapside, Überschreibung der prägenomischen RNA innerhalb des Kapsids in eine zirkuläre partiell doppelsträngige DNA-Form (ocDNA) mit Hilfe der viruscodierten reversen Transkriptase und DNA-abhängigen DNA-Polymerase während der Virusreifung und Ausschleussung. Wegen der zahlreichen Gemeinsamkeiten mit HBV werden die animalen Hepadnaviren sehr häufig als Tiermodelle zur Erforschung der Biologie, Pathogenese und Evaluation von antiviralen Substanzen für die Therapie der humanen Hepatitis B verwendet (Torresi et al., 2000; Schäfer et al., 1998). Deshalb wurde in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung insbesondere das Entenhepatitis-B-Virus-Tiermodell für Studien mit Proteasom-Inhibitoren eingesetzt.

35 2.1.1. Hepadnavirale Viruspartikel und Komponenten

[0033] Im Serum von virämischen Patienten und Tieren findet man neben dem infektiösen Virion (ca. 42 nm Durchmesser) in der Regel 1000 bis 10000 mehr subvirale, nicht infektiöse Partikel von sphärischer oder filamentöser Form. Die viralen Partikel bestehen aus einer Lipiddüll, in welche HBV-Genom-kodierte Oberflächenproteine (HBs oder S, PreS1 oder large S, PreS2 oder middle S) eingelagert sind. Das Nukleokapsid besteht aus dem Nukleokapsidprotein und enthält das partiell doppelsträngige Virusgenom sowie zelluläre Proteine. Dazu gehören unter anderem zelluläre Kinasen.

50 2.1.2. Die frühen Infektionsvorgänge bei Hepadnaviren

[0034] Nach Bindung der viralen Partikel an Oberflächenmoleküle der Hepatozyten und andere Zellen hepatischen und nicht-hepatischen Ursprungs wird das Virus über wenig verstandene Mechanismen in die Zellen und das Virusgenom in den Zellkern transportiert. Jeder der Vorgänge der frühen Schritte der Infektion, bei denen die Wechselwirkung mit zellulären Komponenten eine Rolle spielt, könnte bei Virionen aus Proteasom-behandelten Zellen gestört sein und so deren fehlende oder geringere Infektiosität erklären.

60 2.1.3. Die Synthese der cccDNA von Hepadnaviren und Synthese der viralen RNA

[0035] Während oder nach Eintritt des viralen Genoms in den Zellkern wird das virale Genom zu einem komplett doppelsträngigen supergecoilten DNA-Genom (cccDNA) umgewandelt. Bei diesen Vorgängen sind zelluläre Proteinen beteiligt, deren Funktion durch die in der Erfindung be-

schriebenen verändert sein könnten, und mit der Synthese der cccDNA interferieren könnten. Diese Form des viralen Genoms wird nicht semikonservativ repliziert und ist kein direktes Angriffsziel für die gegenwärtig verfügbaren antiviralen Substanzen. Von der cccDNA werden alle viralen RNAs synthetisiert. Eine der RNAs, das RNA-Prägenom, wird mit Hilfe des P-Proteins ins Nukleokapsid verpackt und dort in DNA überschrieben. Neben den Funktionen des P-Proteins bei der Verpackung des RNA-Genoms, der viralen DNA-Synthese und beim Nukleokapsidsassembly werden andere Funktionen bei der Etablierung einer Infektion vermutet. Außerdem dem Prägenom/C-mRNA werden subgenomische RNAs synthetisiert, von denen die Struktur- und Nicht-Struktur-Proteine translatiert werden. Daneben gibt es gespleißte RNAs und entsprechende virale Proteine.

2.1.4. Die späten Schritte der Hepadnavirusreplikation

[0036] Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Coreproteins spielen eine wichtige Rolle für den Zusammenbau des Nukleokapsids, für die DNA-Synthese, für die Assoziation der Nukleokapsidproteine mit Kern- und Cytosplasmamembranen sowie deren Transport in den Zellkern, und für den Zerfall des Nukleokapsids, welcher notwendig ist, um das Genom in den Zellkern zu schaffen. Die veränderte Phosphorylierung des Nukleokapsids in Proteasom-Inhibitoren-behandelten Zellen (siehe Ausführungsbispiele) könnte an all diesen Stellen mit der Infektiosität der Hepadnaviren und dem Infektionsvorgang interferieren. Hat die DNA-Synthese einen bestimmten Reifezustand erreicht, kommt es zur Umhüllung des Virus. Ein Teil der Nukleokapside wandert zur Kermembran und sorgt so für die notwendige Kopienzahl der cccDNA.

2.1.5 Das Problem der Heterogenität von Hepadnaviren

[0037] Wegen des Schrittes der reversen Transkription des HBV-Genoms in DNA und des Fehlens einer Proofreading-funktion der reversen Transkriptase entstehen während der Vermehrung von HBV häufig Mutationen, ähnlich wie es für HIV- und andere RNA-Viren einschließlich HCV bekannt ist (Günther et al., 1998). Deshalb sind Patienten immer mit einer sehr heterogenen Population von HBV und HCV infiziert. Die Heterogenität beeinflusst die Pathogenese, die Virusresistenz, das Ansprechen auf die Therapie mit Interferonen (IFN) und antiviralen Substanzen (Nukleosidanaloge und andere) sowie die Erkennung der infizierten Zellen durch das Immunsystem. Diese Befunde belegen, dass neue antivirale Strategien für die Verhinderung einer de novo HBV Infektion notwendig und sinnvoll sind, trotz der Verfügbarkeit einer Vakzine und prophylaktisch verabreichbarer Antikörper.

2.2. Möglichkeiten der Therapie einer chronischen HBV-Infektion

[0038] Eine der wenigen Therapiemöglichkeiten einer chronischen HBV-Infektion ist die Behandlung mit Interferonen (IFN). Diese ist anerkannt, zugelassen, aber nur teilweise wirksam. Bei Koinfektionen mit HIV und HCV, die relativ häufig vorkommen, ist die Erfolgsrate einer IFN-Behandlung noch geringer als bei alleiniger HBV- und HCV-Infektion. Alle Reservoirs an HBV und HCV werden selbst bei klinisch erfolgreicher IFN-Behandlung so gut wie nie eliminiert und können zu einer Reaktivierung der Infektion führen (Rehermann et al., 1996).

[0039] Wesentlicher Nachteil einer anti-HBV-Therapie auf der Basis von IFN-Gabe ist, dass diese häufig mit nega-

tiven Nebenwirkungen assoziiert sind. Diese variieren von Patient zu Patient und können von transiente als auch permanenter Natur sein. Diese Nebenwirkungen reichen von Fieber, Müdigkeit, Gewichtsverlust, Haarausfall, Verstärkung einer bestehenden Thrombopenie bis hin zur Auslösung oder Verstärkung von Autoimmunerkrankungen. Kontraindikationen für eine IFN-Therapie sind eine fortgeschritten Leberzirrhose, schlechtes Halten an die Verordnungen, Alkohol- oder Drogenabusus, psychiatrische oder Autoimmunerkrankungen; eine schwere koronare Herzkrankung, zerebrale Anfallsleiden sowie eine ausgeprägte Leuko- oder Thrombopenie sowie ein funktionierendes Nierentransplantat. Relative Kontraindikationen sind Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom, Kinder jünger als 6 Jahre, immunsupprimierte Patienten (HIV-Koinfizierte, Hämodialyse, Medikamenten-induzierte Immundefizienz, genetische Faktoren, Leukämie) (für Review siehe Trautwein und Manns, 2001).

[0040] Die für HBV eingesetzten Nukleosidanaloge hemmen das Umschreiben der prägenomischen RNA in DNA durch die virus-kodierte Polymerase. Lamivudine ist eines dieser in mehreren Ländern zugelassenen Medikamente. Auch wenn Lamivudine weniger Nebenwirkungen zu haben scheint und relativ gut vertragen von den Patienten wird, hat es den großen Nachteil, dass es so gut wie immer zur Selektion von Lamivudin-resistenten HBV Stämmen kommt. Ein in klinischen Studien erprobtes Medikament ist Famcyclovir, das bisher nicht zugelassen ist und auch Kreuzresistenz mit Lamivudine zeigt. Weitere Nukleosidanaloge (z. B. Adefovir und Entecavir) werden in klinischen Studien getestet oder sind erst in der Phase von vorläufigen Testungen. Die Anwendung aller dieser Medikamente dürfte aber ebenfalls mit dem Problem der Selektion von resistenten Stämmen behaftet sein und birgt die Gefahr der Einführung von Mutationen in das Wirtsgenom.

[0041] Seit 1999 ist für die Therapie der chronischen HCV das Guanosinanalogon Ribavirin in Kombination mit Interferonen zugelassen. Die Wirkungsweise dieses Medikaments ist jedoch nur unvollständig geklärt. Eine Eliminierung von HCV bei Gabe von Ribavirin führt nicht zur Viruseliminierung. Ribavirin hat außerdem häufig eine Reihe von Nebenwirkungen, wobei die Ribavirin-induzierte Hämolysie von besonderer Bedeutung ist. (für Review siehe Trautwein und Manns, 2001). Für alle gegenwärtig zugelassenen Medikamente für HBV und HCV sowie HDV (Hepatitis-D-Virus) gilt, dass es eine Vielzahl von Nonrespondern gibt, denen nur grundsätzlich neue Medikamente helfen können, wie sie in dieser Erfindung beschrieben werden.

[0042] Die Risiken des Einsatzes aller bisher eingesetzten antiviralen Medikamente sind noch nicht mit Sicherheit zu beurteilen. Nukleosidanaloge bergen prinzipiell die Gefahr, dass sie auch zu Mutationen in Chromosomen führen, die Anlass zur Entstehung von Krebs geben könnten. Für die im Rahmen der hier vorgestellte Erfindung genannten neuen Medikamente sind nicht mit diesem Risiko behaftet bzw., diese sind sehr viel unwahrscheinlicher oder nicht zu erwarten.

3. Biologie und Behandlung von HCV-Infektionen

[0043] Auch die Infektion mit Hepatitis-C-Virus (HCV) ist eines der großen Weltgesundheitsprobleme. Mit diesem Virus sind ca. 170 Millionen Menschen (d. h. ca. 3%) der Weltbevölkerung infiziert. Manche Länder haben eine Durchseuchung mit HCV von über 10% der Bevölkerung. Im Gegensatz zu HBV gibt es bisher keine effektiven Impfstoffe für HCV. Die HCV-Infektion verläuft in ca. 80% der Fälle chronisch mit unterschiedlichem Schweregrad von Le-

berentzündungen. Ähnlich wie bei HBV ist auch die chronische HCV-Infektion mit einem sehr hohen Risiko der Entstehung von Leberzirrhose und einem Leberkarzinom verbunden. Für beide Erkrankungen gibt es kaum Heilungschancen außer einer erfolgreichen Lebertransplantation. HCV gehört zu den Flaviviren und kodiert ca. 10 Genprodukte. Die Infektion wird in der Regel durch Bestimmung der spezifischen anti-HCV-Antikörper, der viralen Antigene und RNA diagnostiziert. Ähnlich wie bei HBV ist die Pathogenese, die sich durch unterschiedliche Grade der Leberentzündung bis hin zum Leberversagen, der Entstehung einer Leberzirrhose/Fibrose und eines Leberkarzinoms sowie Begleiterkrankungen auszeichnet. Auch die Therapie beruht ähnlich wie bei HBV vorwiegend auf der Behandlung mit Interferon alpha und Derivaten sowie mit Nukleosidanalogen und weiteren Substanzen unbekannter Wirkweise (für Review siehe Trautwein und Manns, 2001).

[0044] Folgende Patentschriften, welche die vorliegende Erfindung nicht unmittelbar betreffen, wurden veröffentlicht: Eine Erfindung, welche Mittel zur Interferenz von HBV-Infektionen auf der Basis von HBV-Protein X. Wechselwirkung mit Proteasom-Untereinheiten beschreibt (US 5872206); ein Verfahren zur Bestimmung der Proteasom-Aktivität in biologischen Proben (WO 00/23614); die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren als Mittel zur Behandlung von Krebs, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (WO 99/22729); die Verwendung von Inhibitoren des UPS als Mittel zur Behandlung von Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (WO 99/15183).

Wesen der Erfindung

[0045] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Mittel zur Hemmung der Freisetzung und der Infektiosität von Hepatitis-B- und C-Viren zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe wurde durch den Einsatz von mindestens einem Proteasom-Inhibitor in einer pharmazeutischen Zubereitung gelöst. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, welche die Aktivitäten des zellulären Proteasom-Pathway hemmen, regulieren oder anderweitig beeinflussen. Es ist auch möglich, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die speziell die enzymatischen Aktivitäten des kompletten 26S Proteasom-Komplexes und der freien, nicht mit regulatorischen Untereinheiten assemblierten 20S katalytisch aktiven Proteasom-Struktur beeinflussen. Diese Inhibitoren können entweder eine oder mehrere oder alle der drei hauptsächlichen proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms (die Trypsin-, die Chymotrypsin- und die Postglutamyl-Peptid hydrolysierenden Aktivitäten) innerhalb des 26S- oder auch des 20S-Proteasom-Komplexes hemmen.

[0046] Eine Variante der Erfindung besteht darin, als Proteasom-Inhibitoren Substanzen einzusetzen, die von Zellen höherer Eukaryoten aufgenommen werden und nach Zellaufnahme mit der katalytischen beta-Untereinheit des 26S-Proteasoms in Wechselwirkung treten und dabei alle oder einzelne der proteolytischen Aktivitäten des Proteasom-Komplexes irreversibel oder reversibel blockieren.

[0047] Als eine weitere Form der Erfindung kommen Mittel zum Einsatz, welche die Aktivitäten der Ubiquitin-konjugierenden als auch der Ubiquitin-hydrolysierenden Enzyme hemmen. Polyubiquitination gilt allgemein als ein Erkennungssignal für die Proteolyse durch das 26S-Proteasom, und Beeinflussung des Ubiquitin-Pathway kann ebenfalls die Aktivität des Proteasoms regulieren.

[0048] Erfindungsgemäß werden als Proteasom-Inhibitoren auch Substanzen eingesetzt, die in verschiedenen For-

men in vivo oral, intravenös, intramuskulär, subkutan, in verkapster Form mit oder ohne Zell-Spezifität-tragende Veränderungen oder anderweitig verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und

5 Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität und/oder hohe Selektivität für bestimmte Zellen und Organe aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relativ hohe metabolische Halbwertszeit und eine relativ geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.

10 [0049] Als Proteasom-Inhibitoren werden des weiteren Substanzen eingesetzt, die in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden, durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen oder total-synthetisch hergestellt werden. Dazu gehören:

a) natürlich vorkommende Proteasom-Inhibitoren:

- Epoxomicin und Eponemycin,
- Aclacinomycin A (auch bezeichnet als Aclarubicin),
- Lactacystin und dessen chemisch modifizierte Varianten, insbesondere die Zellmembran-penetrierende Variante "Clastolactacystein β-Lacton",

b) synthetisch hergestellte:

- modifizierte Peptidaldehyde wie zum Beispiel N-carbobenzoxy-L-leucinyl-L-leucinyl-L-leucinal (auch bezeichnet als MG132 oder zLLL), dessen Borsäure-Derivat MG232; N-carbobenzoxy-Leu-Leu-Nva-H (bezeichnet als MG115); N-Acetyl-L-Leuzinyl-L-Leuzinyl-L-Norleuzinal (bezeichnet als LLNL); N-carbobenzoxy-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H (auch bezeichnet als PST);
- Peptide, die C-terminal α,β -Epoxyketone (auch bezeichnet als Epoxomicin oder Eponemycin), Vinyl-sulphone (zum Beispiel Carbobenzoxy-L-Leucinyl-L-Leucinyl-L-Leucin-vinyl-sulfon oder 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leucinyl-L-Leucinyl-L-Leucin-vinyl-sulfon, auch bezeichnet als NLVS), Glyoxal oder Borgsäure-Reste (zum Beispiel Pyrazyl-CONH(CHPhe)CONH(CHisobutyl)B(OH)₂, auch bezeichnet als "PS-431" oder Benzoyl(Bz)-Phe-boroLeu, Phenacetyl-Leu-Leu-boroLeu, Cbz-Phe-boroLeu); Pinacol-Ester – zum Beispiel Benzyloxycarbonyl (Cbz)-Leu-Leu-boroLeu-Pinacol-Ester – tragen; und
- als besonders geeignete Verbindungen werden Peptide und Peptid-Derivate eingesetzt, welche C-terminal Epoxyketon-Strukturen tragen, hierzu zählen beispielsweise Epoxomicin (Molekülformel: C₂₈H₈₆N₄O₇) und Eponemycin (Molekülformel: C₂OH₃₆N₂O₅);
- chemisch modifizierte Derivate auf der Basis von natürlich vorkommenden, insbesondere ein β -Lacton-Derivat mit der Bezeichnung PS-519 (1R-[15,4R,5S]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dione, Molekülformel: C₁₂H₁₉NO₄), welches sich von dem natürlichen Proteasom-Inhibitor Lactacystin ableitet;
- bestimmte Dipeptidyl Borsäure-Derivate, insbesondere Verbindungen, welche sich von dem Pyranoyl-Phenyl-Leuzinyl-Borsäure-Derivat mit dem Namen "PS-341" (N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-leuzin-Borsäure, Molekülformel: C₁₉H₂₅BN₄O₄) ableiten. Hierzu zählen weiterhin die Verbindungen "PS-273" (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂)

und dessen Enantiomer PS-293, die Verbindung PS-296 (8-Quinolyl-sulfonyl-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-303 (NH₂(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-321 (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Phenylalanin)-B(OH)₂); die Verbindung PS-334 (CH₃-NH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-325 (2-Quinol-CONH-(CH-homo-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-352 (Phenylalanin-CH₂-CH₂-CONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-383 (Pyridyl-CONH-(CHpF-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂. Alle diese Verbindungen wurden bereits beschrieben, unter anderem in Adams et al. (1999).

[0050] Als besonders geeignete Verbindungen haben sich, neben Epoxomicin und Eponemycin, die Proteasom-Inhibitoren PS-519, PS-341 und PS-273 (Millennium Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA 02139, USA) erwiesen. Diese Proteasom-Inhibitoren sind sehr potent, sehr spezifisch für das Proteasom, blockieren keine anderenzellulären Proteasen und haben daher so gut wie keine Nebenwirkungen. Die Proteasom-Inhibitoren PS-341 und PS-519 wurden außerdem sowohl in Tiernmodellen für vorklinische als auch in Menschen (Krebspatienten) für klinische Studien getestet. [0051] Im Rahmen der Erfindungsbeschreibung wird überraschenderweise festgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren späte Prozesse im Replikationszyklus von Hepadnaviren hemmen. Dabei wurde spezifisch beobachtet, dass sich die erfundungsgemäße Verwendung von Proteasom-Inhibitoren dazu eignet, die Produktion von infektiösen Virionen von chronisch mit HBV infizierten Zellen weitgehend oder vollkommen zu unterbinden. Nach Behandlung von HBV-produzierenden Zellen mit Proteasom-Inhibitor tritt sowohl eine Hemmung der Freisetzung von Virionen als auch eine nahezu vollständige Reduktion der Infektiosität der freigesetzten Virionen ein. In Folge dieser neuartigen Aktivitäten können Proteasom-Inhibitoren die Virusreplikation und somit die Neuinfektion von Hepatozyten und damit die Ausbreitung einer HBV-Infektion *in vivo*, in dem Lebergewebe eines HBV-Infizierten, unterdrücken.

[0052] Als weiterer Schwerpunkt der Erfindungsbeschreibung wurde festgestellt, dass die Behandlung von chronisch mit HBV infizierten Hepato-Karzinomzellen mit Proteasom-Inhibitoren bevorzugt das Absterben (hauptsächlich durch Induktion von Apoptose) dieser Krebszellen induziert, während gesunde, primäre Hepatozyten und die anderen nicht proliferierenden Leberzellen sehr viel resisterter gegenüber einer Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren sind. Leberkarzinome sind medikamentös kaum behandelbar und führen in der Regel ohne Lebertransplantation oder Leberresektion zum Tod. Proteasom-Inhibitoren erlangen dadurch eine weiteres therapeutisches Potential für die Behandlung von Hepatitis-Virusinfektionen: Durch die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren kann nicht nur die Ausbreitung der Infektion (durch Blockierung der Produktion infektiöser Virionen), sondern auch die mit der Infektion verbundene Entstehung von Leberzell-Karzinomen unterdrückt, verhindert oder ein bereits etabliertes Leberzellkarzinom geheilt werden. Dieser Anspruch beruht auf der Tatsache, dass die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren – ähnlich der bereits bekannten anti-neoplastischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf eine Vielzahl von Tumoren – eine spezifische Eliminierung von Leberkarzinomzellen *in vivo* bewirken kann. Die anti-neoplastische Wirkung von

Proteasom-Inhibitoren wurde bislang nicht für Leberzellkarzinome gezeigt und stellt daher ein neuartiges therapeutisches Prinzip dar. Proteasom-Inhibitoren können somit zur Behandlung/Bekämpfung/Verhinderung von HBV-induzierter Leberzirrhose, insbesondere primären Leberzellkarzinomen eingesetzt werden.

[0053] Weiterhin können Proteasom-Inhibitoren unter Verwendung der neuartigen antiviralen Wirkung für die Behandlung von folgenden symptomatischen und symptomlosen Hepatitis-Virusinfektionen eingesetzt werden: Hepatitis-A-Virus (HAV), Hepatitis-C-Virus (HCV), Hepatitis-Delta-Virus (HDV), Hepatitis-E-Virus (HEV), Hepatitis-F-Virus (HFV), Hepatitis-G-Virus (HGV). Die Behandlung der Hepatitis B und C mit Proteasom-Inhibitoren sind wegen der weiten Verbreitung, der besonders hohen Pathogenität sowie wegen der Assoziation der chronischen Infektion mit der Entwicklung eines Leberkarzinoms von besonderer Bedeutung.

[0054] Die Proteasom-Inhibitoren können auch in Kombination mit anderen anti-Hepatitis-Medikamenten und sonstigen Therapieschemata eingesetzt werden, z. B. Interferon alpha/beta/gamma und Varianten hiervon (zum Beispiel pegyierte Interferone), Interleukine, Nukelosidanaloga (Lamivudine, Cidovir, Ribavirin und andere), Steroide, Plasmatausch, Thymosin alpha 1, Impfstoffe, passive und aktive Vakzinierung, therapeutische und prophylaktische Vakzinierung, Glycyrrhizin, Stammzelltransplantation, Organtransplantationen, Nahrungstherapie, Immunsuppressiva, Cyclosporine und Derivate hiervon, Amanditin und Derivate, Interleukine und andere Cytokine, nicht Proteasom-selektive Protease-Inhibitoren, Azathioprin, Hämodialyse, sowie hoch aktive antiretrovirale Therapie (highly active antiretroviral therapy, "HAART") bei Co-Infektionen von HBV mit Humanen Immunodefizienzviren (HIV). Da Proteasom-Inhibitoren auch anti-virale Wirkung auf HIV ausüben, ist eine Behandlung von HBV/HIV-Koinfektionen, insbesondere in Kombination mit HAART-Therapie, ein Anwendungsschwerpunkt der Erfindung.

[0055] Eine Verhinderung des Krankheitsausbruches und eine Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus von symptomlosen HBV infizierten Personen ist erfundungsgemäß ebenfalls mit Proteasom-Inhibitoren möglich.

[0056] Die erfundungsgemäße Verwendung von Proteasom-Inhibitoren besteht in der Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitisviren. Die Verwendung zur Hemmung der Vermehrung von Hepadnaviren erfolgt nach den Mechanismen

- 50 a) Blockierung/Reduktion der Freisetzung von neuen Virionen
- b) Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Virionen
- c) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in Kulturen von primären Hepatozyten
- d) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in der Leber *in vivo*. Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren liegt in der Induktion des Absterbens von Hepato-Karzinomzellen, in der Unterdrückung und/oder Verhinderung des Entstehens von Leberzell-Karzinomen sowie in der Therapie von Patienten mit etablierten Leberzellkarzinomen.

[0057] Eine weitere Verwendung besteht in der Behandlung/Bekämpfung/Verhinderung von

- 65 – HBV-induzierter Leberzirrhose und/oder
- HBV-induzierten Leberzellkarzinomen
- HCV-induzierten Leberkarzinomen

- Medikamenten-induzierten Leberkarzinomen
- genetisch bedingten Leberkarzinomen und/oder
- durch die Umwelt bedingten Leberkarzinomen.

[0058] Eine weitere Verwendung liegt in der gezielten Eliminierung von Leberkarzinomzellen, die infolge einer

- HBV-Infektion und/oder
- HCV-Infektion oder
- entsprechenden Koinfektion mit beiden Viren und/oder
- HDV/HBV-Koinfektion

entstehen.

[0059] Weiterhin finden Proteasom-Inhibitoren Verwendung zur

- Verhinderung der Entstehung, des Wachstums und der Metastasierung von Leberzelltumoren sowie zur bevorzugten Zerstörung von Leberkarzinomzellen, in HBV- und HCV-infizierten Patienten und Tieren
- Modulation der Expression, Modifizierung und Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53
- Leberzellregeneration bei Patienten mit Leberentzündung
- Reduktion der Anzahl infizierter Virus-produzierender Zellen im Leberzellgewebe
- Hemmung sowohl der Erhaltung und Persistenz einer bereits etablierten Infektion als auch einer Sekundärinfektion und somit der Ausbreitung einer Infektion, einschließlich der Blockierung der Ausbreitung einer HBV-Infektion *in vivo*
- Behandlung von Koinfektionen mit HBV und Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2
- Behandlung von HBV/HIV-Koinfektionen in Kombination mit der HAART-Therapie
- Verhinderung einer Re-Infektion mit HBV bei Leber- und anderen Organtransplantationen
- Verhinderung einer Re-Infektion mit HBV bei Zelltherapien durch Gabe der Mittel vor, während und nach der Transplantation
- Behandlung und Bekämpfung von Hepatiden in Kombination untereinander
- Verhinderung einer Re-Infektion mit HBV bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die immer Restvirus haben und sich neue Organe infizieren können wie auch bei der Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten
- Verhinderung der Etablierung einer systemischen Hepatitis-Virus-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus oder zur
- Minderung oder Eliminierung der Leberentzündung durch Immunsystemvermittelte Mechanismen.

[0060] Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren besteht in der Verhinderung der Etablierung einer systemischen Hepatitis-Virusinfektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus (zum Beispiel bei Nadel-Stich-Verletzungen mit Virus-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten).

[0061] Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren ist die Vorbeugung einer Hepatitis-Virusinfektion bei Personen mit hohem Risiko einer Neuinfektion, zum Beispiel bei Ärzten, Risiko-Personal in Häusern mit hohem Besucherverkehr, Drogenabhängigen, Reisenden in hochendemische Gebiete für Hepatitis-Viren, in der Krankenbehandlung, für Familienangehörige von chronischen Virusträgern.

[0062] Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibito-

ren besteht in der Verhinderung einer Re-Infektion mit HBV bei Leber- und anderen Organtransplantationen sowie bei Zelltherapien durch Gabe der Mittel vor, während und einige Zeit nach der Transplantation. Die Gabe dieser Mittel

5 ist angezeigt sowohl für die Hochrisikosituation bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die immer Restvirus haben und wo sich neue Organe infizieren können, als auch für die Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten.

[0063] Eine weitere Verwendung besteht darin, dass Proteasom-Inhibitoren die Phosphorylierung von Hepatitis-Viren Core-Proteinen verändern und dadurch die Freisetzung und Infektiosität von Hepatitis-B-Viren herabsetzen oder blockieren.

[0064] Eine weitere Verwendung liegt in der Kombination mit bereits in der anti-viralen Therapie von Hepadnaviren verwendeten Therapeutika.

[0065] Eine wesentliche Anwendung besteht in der Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Herstellung von Mitteln bzw. pharmazeutischen Zubereitungen zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitisviren sowie zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von Hepatiden.

[0066] Die Prinzip-Lösung der Aufgabe wird am Beispiel von DHBV gezeigt. Es wird dargestellt, dass nach Zugabe von verschiedenen Substanzklassen von Proteasom-Inhibitoren die Produktion von infektiösen Viruspartikeln aus bereits infizierten Zellen gehemmt wird.

[0067] Erfnungsgemäß wird dieses Phänomen sowohl am Beispiel der Nichtinfizierbarkeit von primären Hepatozyten (Ente, Murmeltier, Tupaia und Mensch), von Gallengangszellen, von Mischkulturen aus Hepatozyten und Nichthepatozyten, von Zellen des hämatopoetischen System, als auch von etablierten Hepatomazellen mit Hepatitis B-, C- und D-Viren aus Proteasom-Inhibitoren-behandelten Zellen dargestellt. Darüber hinaus wird dies durch analoge Infektionsversuche in Tiermodellen *in vivo* dargestellt (*uPA/RAG2-Mausmodell* repopuliert mit Leberzellen aus Mensch, Murmeltier und Tupaia; mit Enten, Murmeltieren und Tupaias). Die Vorgehensweise ist, dass HBV, HCV, HDV Viruspartikel und Kombinationen hiervon aus den Medien von Produzentenzellen, welche für unterschiedliche Zeiten und Dosen mit Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden, geerntet werden und die Infektiosität der Viruspartikel durch Infektion von Hepatitis-Virusfreien Zellen getestet wird. Hierzu werden die oben genannten Zellen mit den Viruspartikeln inkubiert und anschließend die Infektion oder das Ausbleiben der Infektion durch Analyse der intra- und extrazellulären Komponenten von Nachkommenviren überprüft. Konkret werden analysiert sowohl der Status der Neusynthese von viralen Antigenen (Oberflächenproteine und Nukleokapsidprotein sowie von e-Antigen durch Immunoblot, ELISA und metabolische Markierung mit anschließender Autoradiographie der im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine) als auch Virusnukleinsäuren (RNA durch Northern, DNA durch Southern und entsprechende Dot blots und PCR- und RT-PCR-Analysen). Außerdem werden die viralen Antigene durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe von Virus-spezifischen Antikörpern mikroskopisch nachgewiesen.

[0068] Erfnungsgemäß wird am Beispiel von chronisch mit DHBV infizierten Enten-Hepatozyten gezeigt, dass nach Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren die Lebensfähigkeit der primären Hepatozyten nicht wesentlich beeinträchtigt ist, ebenso ist die Proteinsynthese in diesen primären Zellen nicht wesentlich blockiert. Jedoch wird im Rahmen der Erfindungsbeschreibung festgestellt, dass die freigesetzten Vironen faktisch nicht infektiös sind und daher keine Neuinfektionen auslösen.

fektion in primären Hepatozyten auslösen können. Im Ergebnis der Erfahrung wird damit gezeigt, dass die Inhibition des Proteasom-Pathway mittels Proteasom-Inhibitoren die Produktion von infektiösen DHBV-Virionen blockiert sowie die Sekretion insgesamt von viralen Partikeln sowie von e-Antigen inhibiert, ohne dass dabei die Proteinsynthese von Leberzellen signifikant beeinträchtigt wird.

[0069] Erfahrungsgemäß wird am Beispiel DHBV gezeigt, dass unter der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren die biochemische Modifizierung des Nukleokapsidproteins verändert ist. Überraschenderweise wird festgestellt, dass core-Proteine welche unter Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren exprimiert werden, eine Veränderung des Molekulargewichtes zeigen. Diese neuartige Beobachtung lässt auf eine Veränderung der Phosphorylierung des Nukleokapsidproteins rückschließen. Im Ergebnis dieser Beobachtung wird daher festgestellt, dass die Veränderung in der Modifizierung des Nukleokapsidproteins wahrscheinlich die mechanistische Grundlage für die reduzierte Infektiosität der aus den PI-behandelten Zellen sekretierten DHBV-Viren ist.

[0070] In einem weiteren Teil der Erfahrung wird gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren den Zelltod von Leberkarzinomzellen induzieren. Erfahrungsgemäß wird am Beispiel von kultivierten Enten-Hepatozyten gezeigt, dass primäre Leberzellen relativ resistent gegenüber Proteasom-Inhibitoren bis zu einer Konzentration von ca. 10 microM sind, während Leberkarzinomzellen bereits bei 100-fach niedrigeren Konzentrationen von Proteasom-Inhibitoren abgetötet werden.

[0071] Die Induktion des Zelltodes (ausgelöst durch apoptotische, nekrotische oder andere Prozesse) in HBV-produzierenden Leberkarzinom-Zellen nach Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren wird erfahrungsgemäß am Beispiel von humanen Leberkarzinomzelllinien (zum Beispiel HepG2.2.15) dargestellt. Nachgewiesen wird dieser neuartige Mechanismus mittels Trypanblau Ausschlussfärbung (lebende Zellen werden nicht gefärbt, tote Zellen nehmen den Farbstoff auf), durch Nachweis der Annexin-V Oberflächenexposition durch Immunfluoreszenz, durch Detektion der DNA-Fragmentierung, durch Immunoblotnachweis und Fluoreszenzfärbungsnachweis von prozessierten und aktivierte Caspases und enzymatischen Nachweis der Caspaseaktivität. In einer weiteren Ausführungsform der Erfahrung werden eine Hühnerhepatomzelllinie (LMH) und primäre Hepatozyten aus Enten (DHBV infiziert und nicht-infiziert) sowie Hühnern (nicht DHBV infiziert) auf selektive Toxizität hinsichtlich Proteasom-Inhibitoren für Hepatomazellen im Verbund mit nicht transformierten Hepatozyten getestet.

[0072] Das bevorzugte Absterben von Leberkarzinomzellen begründet sich erfahrungsgemäß in der anti-neoplastischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren.

[0073] Beispielsweise besitzt der bekannte Proteasom-Inhibitor PS-341 eine selektive zytotoxische Aktivität gegen ein breites Spektrum an humanen Tumorzellen, eine Aktivität, welche mit der Akkumulation von p21 und Zellzyklus-Arrest in der G2-M-Phase mit nachfolgender Apoptose verbunden ist. Die Expression, Modifizierung und Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53 wird ebenfalls durch die Wirkung von Proteasom-Inhibitor PS-341 (PI) beeinträchtigt. Erfahrungsgemäß kann durch diese und andere Mechanismen die gezielte Eliminierung von Leberkarzinomzellen bewirkt werden, welche infolge einer HBV-Infektion und HCV-Infektion oder entsprechender Koinfektion mit beiden Viren oder mit HDV/HBV-Koinfektion mehr als 100 mal häufiger entstehen als bei nicht infizierten Zellen.

[0074] Der wesentliche Vorteil der Erfahrung besteht darin, dass mit der Behandlung von Proteasom-Inhibitoren

zwei für die Bekämpfung viraler Hepatitis-Infektionen wesentliche Effekte ausgelöst werden können: Zum einen wird die Produktion von infektiösen Viruspartikeln und damit die Infektionsausbreitung im Organismus gehemmt. Zum anderen wird die Entstehung, das Wachstum und die Metastasierung von Leberzellkarzinomen verhindert, welche infolge einer Hepatitis-Virusinfektion nach einer Persistenzphase sehr häufig auftritt. Darüber hinaus werden bereits bestehende Leberkarzinome durch die Proteasom-Inhibitoren zerstört, nicht aber die wenig oder nicht proliferierenden normalen Zellen der Leber.

[0075] Aufgrund dieser neuartigen Behandlungsmethode können daher vielfältige therapeutische Effekte durch den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren bei Infektionen mit Hepadna- und anderen Hepatitisviren ausgelöst werden. Wesentlicher Vorteil neben den Vorteilen der Blockierung der Infektiosität der freigesetzten Viren sowie der Verhinderung von Leberzellkarzinomen ist die Tatsache, dass mit dieses Strategie zelluläre Faktoren getroffen werden, welche für die Replikation von Hepadna- und anderen Hepatitisviren essentiell sind, jedoch eine sehr viel höhere genetische Stabilität im Vergleich zu viralen Faktoren beinhaltet. Aufgrund dieser genetischen Stabilität der Zielstruktur dieser neuartigen anti-viralen Strategie ist mit dem Auftreten von Resistenz-Erscheinungen, wie sie für viele der bislang bekannten Inhibitoren einer HBV- und HCV-Infektion bekannt sind, nicht zu rechnen. Insbesondere gilt dies für die Polymerasemutanten von Hepatitis B und C Viren, die bei Nukleosidanalog-Behandlung so gut wie immer nach einer relativ kurzen Zeit auftreten. Dies gilt auch für Immunescape-Varianten, wie sie bei passiv und aktiv Vakzinierter sowie natürlicherweise auftreten. Gleichermaßen gilt für Interferonresistente Stämme von HBV und HCV.

[0076] Die Prinzip-Lösung wird am Beispiel von primären Entenhepatozyten gezeigt, welche mit DHBV-Viruspräparationen infiziert werden. Chronisch mit DHBV infizierte primäre Entenhepatozyten, gewonnen durch Leberperfusion und Kollagenase-Behandlung aus der Leber von kommerziell erwerbblichen Enten, die häufig bereits mit DHBV infiziert sind, werden mit verschiedenen Klassen von Proteasom-Inhibitoren behandelt, inklusive solcher Proteasom-Inhibitoren, welche sich bereits in klinischer Testung für die Behandlung von Krebspatienten befinden (zum Beispiel die Proteasom-Inhibitoren PS-341, PS-273, PS-519). Nach der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren wird im Rahmen der Erfahrung festgestellt, dass die behandelten Hepatozyten ihre Fähigkeit weitgehend oder vollständig verloren haben, infektiöse Viruspartikel zu produzieren. Aufgrund dieser neuartigen Aktivitäten von Proteasom-Inhibitoren ist davon auszugehen, dass die Applikation von *in vivo* verträglichen Proteasom-Inhibitoren die Infektionsausbreitung von Hepadnaviren im infizierten Organismus unterdrückt werden kann. Es ist weiterhin im Rahmen der Erfahrung davon auszugehen, dass mit der neuartigen anti-viralen Strategie das Virusreservoir einer Hepadnavirusinfektion vollständig eliminiert und damit eine oder vollständige Heilung einer Infektion mit Hepadnaviren erzielt werden kann. Dieser Anspruch begründet sich insbesondere auf der Tatsache, dass mit dieser neuartigen Behandlung die Infektionsausbreitung und damit die Neuinfektion von Leberzellen verhindert werden kann. Auch wenn die intrazelluläre Synthese von viralen Proteinen und Nukleinsäure in bereits infizierten Zellen nicht nachweisbar in der Menge reduziert wird, kann die Behandlung zur vollständigen Eliminierung des Virus führen, da Hepatitis-infizierte Zellen i. d. R. nur eine begrenzte Lebenszeit haben. Die Leberzellregeneration ist bei Patienten mit Leberentzündung besonders hoch. Deshalb sollten die in diesen Patienten häufiger entstehenden virusfreien Hepato-

zyten wegen der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren nicht de novo infiziert werden können.

[0077] Erfundungsgemäß wird gezeigt, dass der hemmende Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die Virusvermehrung von Hepadnaviren folgende Mechanismen beinhaltet:

1. Blockierung/Reduktion der Freisetzung von neuen Virionen;
2. Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Virionen;
3. Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in Kultur von primären Hepatozyten;
4. Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in der Leber *in vivo*.

[0078] Zur Lösung der Aufgabe wurden im Rahmen der Erfundung verschiedene proteinchemische, molekular-virologische und immunhistologische Studien an HBV-infizierten Zellen durchgeführt. Erfundungsgemäß wird der durch Proteasom-Inhibitoren ausgelöste Defekt in der Infektiosität von Hepadnaviren mittels biochemischer Methoden dargestellt. Dazu wurden Western Blot-Studien an DHBV-Proteinen durchgeführt.

[0079] Ebenfalls wird im Rahmen der Erfundungsbeschreibung die Blockierung der Neuinfektion von primären Hepatozyten mit Virus, welches aus Proteasom-Inhibitoren behandelten Zellen isoliert wurde, mittels Immunfluoreszenz-Messung ermittelt. Die dabei gewonnenen Informationen ermöglichen die Darstellung des hemmenden Effektes von Proteasom-Inhibitoren auf die Infektion von kultivierten primären Hepatozyten. Mit Hilfe dieser Methoden wird gezeigt, dass nach Behandlung von infizierten Zellen mit Proteasom-Inhibitoren faktisch keine infektiösen Viruspartikel von der Zelle mehr freigesetzt werden können. Durch diese in vitro Infektionsstudien wird gezeigt, dass verschiedene Substanzklassen von Proteasom-Inhibitoren alle den gleichen Effekt auslösen: die Blockierung der Produktion von infektiösen Hepadnaviren.

[0080] Ferner wird erfundungsgemäß die durch die Wirkung der Proteasom-Inhibitoren reduzierte Infektiosität freigesetzter unreifer HBV-Virionen mittels End-Punkt-Titrationstudien in primären Hepatozyten dargestellt. Dabei wird gezeigt, dass allein eine Inkubation mit Proteasom-Inhibitoren für 24 Stunden (etwa der Zeit eines HBV-Replikationszyklus) zu einer totalen Blockierung der Infektiosität führt, denn mit den verwendeten Methoden konnte faktisch kein Virus-Titer in den Zellkulturüberständen von Zellen beobachtet werden, welche mit Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden.

[0081] Das in der Erfundungsbeschreibung dargestellte Prinzip der Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Blockierung einer Infektion mit Hepadnaviren ist neuartig in Hinsicht auf die Verwendung einer bereits bekannten Substanzklasse (den Proteasom-Inhibitoren) für eine neue Aktivität, welche sich in folgenden therapeutischen Konzepten zusammenfassen lässt:

- die Blockierung der Produktion von infektiösen Hepadnaviren und damit die Verhinderung der Infektionsausbreitung *in vivo*, dem Leber-Gewebe einer infizierten Person;
- die Induktion des Absterbens von Leberkarzinomzellen, welche in direkter oder indirekter Folge einer Infektion mit Hepadnaviren entstanden sind.

[0082] Gleichzeitig ist die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren auch neuartig hinsichtlich des Anwendungsprin-

zips. Bislang sind keine Substanzen/Prinzipien/Methoden bekannt, welche späte Prozesse der Replikation von Hepadnaviren, speziell der Freisetzung von infektiösen Virionen beeinflussen. Weiterhin ist neu, dass die Verwendung von

Proteasom-Inhibitoren zur Blockierung der Replikation von Hepatitis-Viren führt. Dieser Inhibitionsmechanismen ist in allen Wirtszellen des Virus, den Leberhepatozyten, konserbiert. Im Vergleich zu bisherigen antiviralen Methoden der Behandlung von Hepatitis-Infektionen, welche essentielle Komponenten des Virus direkt treffen, ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Resistenzmechanismen bei Applikation von Proteasom-Inhibitoren in der Behandlung von Hepadnavirus-Infektionen um Größenordnung geringer. Die Neuartigkeit dieses Wirkprinzips von Proteasom-Inhibitoren zeigt sich auch in der Tatsache, dass Proteasom-Inhibitoren ein breites Wirkungsspektrum gegenüber unterschiedlichen Hepatitis-Viren (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV) besitzen. Der inhibitorische Effekt wurde im Rahmen der Erfundung mit gleicher Intensität bei verschiedenen primären als auch klonierten Hepatitis-Viren beobachtet.

[0083] Neuartig ist weiterhin das Prinzip der Wirkung von Proteasom-Inhibitoren, die zwar nicht den Viruseintritt, wohl aber die Produktion von infektiösen Viruspartikeln von bereits mit Hepadnaviren infizierten Zellen verhindern als auch die Freisetzung des viruscodierten e-Antigens, welches für die Etablierung einer chronischen Infektion notwendig ist, verhindert. Dadurch wird wesentlich die Menge an infektiösen Virionen (Viruslast) sowie des für die Etablierung einer chronischen Infektion notwendigen e-Antigens und somit die Infektionsausbreitung *in vivo* reduziert.

[0084] In der Summe dieser neuartigen Mechanismen lässt sich feststellen, dass die verminderte Freisetzung von noch dazu wenigen oder gar nicht infektiösen Viruspartikeln im Netto-Effekt bei gleichzeitigem Zelltod von Virusproduzierenden Karzinomzellen im Falle einer *in vivo* Anwendung von Proteasom-Inhibitoren die Menge an infektiösen Virionen in einem mit Hepadnaviren infizierten Organismus verringert. Somit wird insgesamt die Zahl infizierter Produktionszellen im Leberzellgewebe reduziert. Dies macht die Anwendung von Proteasom-Inhibitoren allein oder in Kombination mit bereits in der anti-viralen Therapie von Hepadnaviren verwendeten Therapeutika attraktiv.

[0085] Im Rahmen der Erfundung wird erstmalig gezeigt, dass überraschenderweise nach Inaktivierung des UPS durch Behandlung von chronisch mit DHBV infizierten primären Hepatozyten die Freisetzung von infektiösen DHBV-Viruspartikeln blockiert wird. Die spezifische Infektiosität der freigesetzten Virionen ist dramatisch erniedrigt. Mit allgemein üblichen Methoden der Infektiositätsbestimmung kann kein spezifischer Titer an neu produzierten Viruspartikeln in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden, deshalb wurde ein Einzelinfektionstest angewandt (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 1). Erfundungsgemäß werden hierzu primäre Entenhepatozyten, welche aus Lebern von Entenembryonen gewonnen und *in vitro* kultiviert wurden, mit DHBV-haltigen Zellkulturüberständen infiziert. Diese DHBV-haltigen Zellkulturüberstände wurden von chronisch mit DHBV infizierten primären Entenhepatozyten gewonnen, welche für 2 Tage mit 10 microM Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden. Zu einer parallelen Kulturen wurden keine Inhibitoren zugesetzt. Zum Zeitpunkt der maximalen Virusproduktion (ca. 90-% der Hepatozyten einer primären Leberzellkultur befindet sich in der akuten Infektionsphase) wurde die Behandlung der Virusproduzierenden Kulturen begonnen. Die Menge an freigesetzten DHBV-Virionen wird mittels DNA-dotblot-Analyse der extrahierten DNA aus Viruspartikeln sowie mittels Western blot Analyse des viralen core-Proteins untersucht. Dabei wurde eine 5-10-fa-

che Reduktion der freigesetzten DHBV-Virionen beobachtet.

[0086] Die spezifische Infektiosität der neu produzierten DHBV-Virionen wird mittels Titration in permissiven Kulturen an primären Entenhepatozyten ermittelt. Die Feststellung der Anzahl an infizierten Zellen erfolgt durch core- und preS-Immunfärbung. Bei Verwendung von verschiedenen Verdünnungen der Zellkulturüberstände als Inokulum wird festgestellt, dass in Zellen, welche mit Zellkulturüberständen von den mit Proteasom-Inhibitoren behandelten Kulturen inkubiert wurden, kein einziges Infektionsereignis nachweisbar ist. In keiner der für die Titration verwendeten Kulturen konnte eine neu-infizierte Zelle mittels Immunfluoreszenz für DHBV core- oder preS-Proteine festgestellt werden. Erfundungsgemäß wird mit diesem Ergebnis eine neuartige Aktivität von Proteasom-Inhibitoren beansprucht (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 2).

[0087] Diese neuartige Aktivität der Proteasom-Inhibitoren kann nicht auf rein unspezifische Beeinträchtigungen des Zellmetabolismus durch Abschaltung des UPS zurückgeführt werden, und zwar aus folgenden Gründen: Dieser Totalausfall an infektiösen DHBV-Virionen ist nicht auf eine allgemeine Inhibierung der Proteinsynthese und DHBV-Expression in der Produzentenzelle zurückzuführen, da zum einen während der 2-tägigen Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren keine toxischen Effekte in den primären Entenhepatozyten beobachtet wurden, und zum anderen die Analyse der Expression von intrazellulären DHBV-Proteinen mittels Western blot-Technik keinen signifikanten Effekt der Proteasom-Inhibierung auf die Expression des DHBV-core-Proteins zeigte (siehe Ausführungsbeispiel 2).

[0088] Die Effizienz der Proteasom-Inhibitoren hinsichtlich der Blockierung des Proteasom-Pathway in den behandelten Hepatozyten wurde mittels Western blot Analyse nachgewiesen unter Verwendung von Antikörpern, welche poly-ubiquitinisierte Proteine erkennen. Es ist deutlich, dass bei allen getesteten Proteasom-Inhibitoren eine deutliche Akkumulation von poly-ubiquitinisierten Proteinen erfolgt. Somit kann festgestellt werden, dass diese Inhibitoren in primären Hepatozyten voll wirksam sind.

[0089] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird gezeigt, dass die Behandlung von chronisch mit HBV infizierten humanen Hepatom-Zelllinien mit Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von HBV-spezifischen Proteinen, insbesondere von HBs- und HBe-Antigen bewirkt (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 5). Ähnlich der Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf DHBV wurde eine deutliche Inhibition der Sekretion von HBV-Proteinen beobachtet.

[0090] In einer weiteren Form der Erfindung wird gezeigt, dass aufgrund der neuartigen Wirkung auf Freisetzung und Infektiosität von Hepatitis-Viren Proteasom-Inhibitoren die Ausbreitung einer HBV-Infektion in kultivierten Hepatozyten verhindern. Erfundungsgemäß wird dabei nachgewiesen, dass durch die Sekundärinfektion, das heißt die Übertragung einer bereits etablierten Infektion auf benachbarte Zellen, komplett verhindert wird. Dieser inhibitorische Effekt auf die Sekundärinfektion wurde in primäre Enten-Hepatocyten nachgewiesen, welche nach Primärinfektion für mehrere Tage mit Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden. Entsprechend der neuartigen Effekte von Proteasom-Inhibitoren wurde in den behandelten primär infizierten Zellen sowohl eine geringere Expression der viralen Antigene als auch wegen der Blockade der Sekundärinfektion eine geringere Zahl an neu infizierten Zellen festgestellt (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 3).

[0091] Erfundungsgemäß ist dieser inhibitorische Effekt der Proteasom-Inhibitoren auf die DHBV-Sekundärinfektion vergleichbar mit der pharmakologischen Wirkung der

Droge Suramin, von der bekannt ist, dass sie selektiv eine HBV-Sekundärinfektion blockiert, ohne dabei mit der bereits etablierten primären Infektion zu interferieren.

[0092] Im Unterschied zu den verwendeten Proteasom-Inhibitoren ist Suramin jedoch eine sehr toxische Substanz, welche in vivo für die Behandlung von Hepatitis-Infektionen nicht verwendet werden kann. Darüber hinaus – und im Gegensatz zu Suramin – führt die Hemmung der Proteasomaktivität additiv zu einer Reduktion der HBV-Genexpression und bewirkt erfundungsgemäß die Überlagerung zweier antiviraler Effekte von Proteasom-Inhibitoren, die Inhibition sowohl der Primär- als auch der Sekundärinfektion.

[0093] Im Rahmen der Erfindung wird erstmals festgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren sowohl die Erhaltung und Persistenz einer bereits etablierten Infektion hemmen als auch die Sekundärinfektion und somit die Ausbreitung einer Infektion mit Hepatitis-Viren in Hepatozyten komplett blockieren. Entsprechend dieser neuartigen Erfindung sind Proteasom-Inhibitoren geeignete Substanzen, um die Ausbreitung einer HBV-Infektion in vivo zu blockieren.

[0094] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird erstmals festgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren relativ geringe toxische Effekte in primären Hepatozyten auslösen, jedoch ein bevorzugtes Absterben von Leberkarzinomzellen bewirken. Erfundungsgemäß wird hierzu gezeigt, dass primäre Hepatozyten tagelange Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren bis zu Konzentrationen von 10 microM tolerieren. Im Unterschied dazu sterben humane Leberkarzinomzellen bereits bei 1000-fach niedrigeren Konzentrationen an Proteasom-Inhibitoren (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 4). Die unterschiedliche Toxizität von Proteasom-Inhibitoren auf primäre Hepatozyten im Vergleich mit humanen Hepatoblastoma-Zellen wurden mittels Dosis-Limitierungsstudien mit Proteasom-Inhibitoren untersucht. Die Vitalität der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Parallel Kulturen wurden mit steigenden Konzentrationen an Proteasom-Inhibitoren (10 microM, 3 microM, 1 microM, 10 nanoM und 1 nanoM) für mehrere Tage behandelt. Zusätzlich wurde die Funktionalität der Hepatozyten mittels Fluoreszenzvitalfärbung bestimmt. Dabei wurde erfundungsgemäß festgestellt, dass primäre Entenhepatozyten relativ hohe Konzentrationen von Proteasom-Inhibitoren bis zu ca. 10 microM tolerieren können, während proliferierende Leberkarzinomzellen sehr viel sensibler gegenüber der toxischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren sind. Auf diesem neuartigen Effekt von Proteasom-Inhibitoren beruht der erfinderische Anspruch, dass mit der Behandlung von Proteasom-Inhibitoren nicht nur die Ausbreitung einer HBV-Infektion verhindert, sondern auch durch HBV verursachte oder mit chronischer HBV-Infektion assoziierte Leberzellkarzinome therapiert werden können.

[0095] Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

55

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

60 Hemmung der Proteasom-Aktivität hat keinen wesentlichen Einfluss auf die intrazelluläre virale Genexpression, blockiert jedoch drastisch die Freisetzung von Viruspartikeln aus chronisch DHBV infizierten Hepatozyten

65 [0096] Primäre Entenhepatozyten und andere Nichtparenchymzellen der Leber wurden aus Entenembryonen durch Kollagenase-Behandlung im wesentlichen nach einer bereits beschriebenen Methode gewonnen (Köck et al., 1993).

Befruchtete Peking Enteneier wurden von einer Zuchtfirma (Wichmann, Deutschland) käuflich erworben. Die Bebrütung der Eier erfolgte in einem automatisierten Brutschrank bei 37°C und 50% Humidität für mindestens 21 Tage. Nach Eröffnung des Eies und der Entnahme des Embryos, erfolgte dessen Sakrifizierung und Blutentnahme. Anschließend wurde die Leber unter Exklusion der Gallenblase entnommen, mechanisch zerkleinert und in 3 ml Williams E Medium (GIBCOBRL, Paisley, Scotland) mit 0.5% Kollagenase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) aufgenommen und für 1 h bei 37°C verdaut. Die Zellen wurden zwimal mit nativem Williams E Medium gewaschen, die vitalen und dissoziierten Zellen durch 10%ige Percoll-Dichte-Zentrifugation (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) von größeren Zellaggregaten und Zelltrümmern getrennt. Parallel wurden die entnommenen Blutseren auf die Präsenz einer natürlichen kongenitalen DHBV-Infektion mittels Protein-Dot Blotanalyse mit PreS-Antiserum getestet (Sunjach et al., 1999). Hepatozyten aus DHBV-positiven Tieren wurden gepoolt und in diesem Experiment eingesetzt. Die Zellen wurden in Williams E Medium (GIBCOBRL, Paisley, Scotland), supplementiert mit 2 mM L-Glutamin (GIBCOBRL, Paisley, Scotland), 100 Einheiten ml⁻¹ Penicillin, und 100 microg ml⁻¹ Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) 15 mM HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethanesulfonic acid]) (pH 7.2) (alle von GIBCOBRL, Paisley, Scotland), 10⁻⁵ Hydrocortison, 10⁻⁹ M Insulin und 1.5% DMSO (alle von Sigma, Deisenhofen, Deutschland) resuspendiert und mit einer Dichte von ca. 8 × 10⁵ pro Well in 12 Well Mikrotiterplatten (Greiner, Solingen, Deutschland) ausgesät und bei 37°C kultiviert. Ca. 4 h nach der Ausplattierung wurde das Medium gewechselt, und ein weiterer Mediumwechsel fand 24 h später statt. Wenn nicht anderes angegeben, wurde das Medium im folgenden alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Eine Woche nach Aussaat des Gemisches aus primären Hepatozyten und anderen Leberzellen wurde das Kulturmedium erneut gewechselt und die Zellen mit neuem Medium, welches nun unterschiedliche Konzentration an PI (10 microM, 3 microM, 1 microM, 10 nanoM, und 1 nanoM) bzw. keinen Inhibitor enthielt, inkubiert. PI wurde in PBS gelöst wie beschrieben (Adams und Stein, 1996; Adams et al., 1996) und ein Aliquot der 1000-fach konzentrierten Stock-Lösung dem Medium zugesetzt. Die Morphologie der Zellen während der Behandlungsphase wurde alle 12 h (Stunden) lichtmikroskopisch überprüft. Nur bei einer Konzentration von 10 microM PI wurden die ersten, auf Toxizität deutenden morphologischen Veränderungen beobachtet. Diese traten nach etwa 48 h Behandlung auf und beinhalteten eine feingranuläre Vakuolisierung, Verlust der makrovakuolären Fetttröpfchen sowie Abflachung der Hepatozyten, während bei nicht-parenchymalen Zellen Abrundung, Schrumpfung und die Ablösung vom Boden der Zellkulturschale das Bild bestimmte. Bei Konzentrationen kleiner als 10 microM PI wurden selbst nach 48 h Behandlungszeit keine signifikanten morphologischen Veränderungen bei Hepatozyten beobachtet, welche auf PI bedingte Veränderungen des Zellmetabolismus schließen lassen könnten.

[0097] Im Unterschied dazu war eine kontinuierliche Behandlung für 72 h mit 1 microM P nicht vereinbar mit der Vitalität der nicht-parenchymalen Zellen. Das Phasenkontrastbild (Fig. 1) zeigt einen relativ großen Bereich mit einem ehemaligen Cluster von nicht-parenchymalen Zellen, wo nach Behandlung mit 1 microM P fast keine adhärenten Zellen mehr vorhanden sind. Die Hepatozyten haben dagegen ihre normale Morphologie beibehalten (Fig. 1, Blockpfeil). Die Höchstfärbung (Fig. 1) belegt, dass die restlichen nicht-parenchymalen Zellen abgerundet und pyknotisch

sind (Pfeile).

[0098] Nach der Behandlung der chronisch DHBV infizierten Hepatozyten für 48 h mit unterschiedlichen Dosen an PI (10 microM, 3 microM, 1 microM, 10 nanoM, und 1 nanoM) bzw. keinen Inhibitor wurden die Zellkulturerstände geerntet und zentrifugiert (4000 rpm für 5 min). Die Menge der freigesetzten viralen Partikeln wurde mittels eines PreS-Antigen spezifischen Dot-Blots (Fig. 2) und eines Immunoblots (Fig. 3) bestimmt (Bruns et al., 1998). Für Dot Blotanalyse wurden Aliquots von 300 microl mittels eines Apparates (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) auf Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) aufgedotet, luftgetrocknet und anschließend mit PBS (phosphate buffered sahne) gewaschen. Für Western Blotanalyse wurde 5 microl Überstands nach Zugabe von SDS-PAGE Proben-Puffer durch Kochen für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Semi-Dry Transfertechnik (Biorad, München, Deutschland) auf Nitrozellulose elektrotransferiert.

[0099] Nach Blocken mit 5% Magermilch erfolgte die Inkubation der Membranen mit PreS-spezifischem Antiserum (Kaninchen anti-preS Kpn; Fernholz et al., 1993). Die markierten Proteine wurden mit enhanced Chemolumineszenzmethode (ECL) (Pierce, Rockford, USA) sichtbar gemacht. Fig. 2 und 3 zeigen, dass die Proteasom-Inhibitor-Behandlung von DHBV infizierten Hepatozytenkulturen zu einer drastischen dosisabhängigen Verminderung an PreS-Protein im Medium führt. Selbst bei einer relativ niedrigen Konzentration von 0.01 microM PI wurde eine fast 10-fache Inhibition der Freisetzung der subviralen Partikel beobachtet (Fig. 3). Da PreS-Protein ein struktureller Bestandteil aller viralen Partikel ist (leere subvirale Partikel und DNA-haltige infektiöse Virionen) ist, reflektiert die PreS-Proteinmenge im Dot- und Western Blot unmittelbar die Menge an umhüllten Viruspartikeln, welche während der Behandlungszeit in das Medium sezerniert wurden.

[0100] Der Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die Menge der ins Medium freigesetzten, Genom enthaltenden viralen Partikel wurde mittels DNA-Dot Blot analysiert (Sunjach et al., 1999). Nach der Behandlung der chronisch DHBV infizierten Hepatozyten für 48 h mit unterschiedlichen Dosen an PI (10 microM, 3 microM, 1 microM und 10 nanoM) bzw. keinen Inhibitor wurden die Zellkulturerstände geerntet und zentrifugiert (4000 rpm für 5 min). Nach Aufdotted von Proben (jeweils 200 microl) auf Nitrozellulose-Membran, wurde sie mit einem alkalischen Buffer (0.5 M NaOH und 1.5 M NaCl) 2 Mal jeweils 1.5 min auf 3 MM Whatman-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) denaturiert und anschließend mit einem neutralen Buffer (0.5 M Tris · HCl, pH 7.4 und 3 M NaCl) 4 Mal für jeweils 1 min auf 3 MM Whatman renaturiert. Nach Lufttrocknung und Crosslinking der Membran erfolgte anschließend deren Hybridisierung mit 32P-markiertem kloniertem DHBV-Genom als Sonde. Die Signale wurden durch Autoradiographie nach einem Standardprotokoll (Sunjach et al., 1999) sichtbar gemacht. Die Fig. 4 zeigt, dass PI die Menge der freigesetzten kompletten Viruspartikel mindestens um den Faktor von ca. 4 reduziert. Das Ergebnis der DNA-Bestimmung korreliert somit mit der in ähnlicher Weise reduzierten Menge an sezerniertem PreS-Antigen (Fig. 2 und 3).

[0101] Um den Einfluss der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren auf die intrazelluläre DHBV-Expression zu testen, wurden die parallel behandelten und unbehandelten Zellen mit 200 microl Puffer (50 mM Tris · HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Natrium-Deoxycholat), komplementiert mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail

(Complete, Roche, Mannheim) lysiert. Die Lysate wurden von der unlöslichen Zelifraktion durch Zentrifugation (14,000 rpm, 10 min, 4°C) getrennt und jeweils 20 microl der geklärten Gesamtlysate wurden nach Zugabe von Laemmli-Puffer durch Kochen für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Semi-Dry Transfertechnik (Biorad, München, Deutschland) auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden mit 5% Magermilch (Biorad, München, Deutschland) geblockt und nach Waschen mit TBS (tris buffered sahne) mit Antikörpern gegen PreS- (Fernholz et al., 1993) oder gegen Core-Protein (Bremer et al., 2001) inkubiert (Fig. 5 und 6). Die markierten viralen Proteine wurden anschließend mittels enhanced Chemolumineszenz (Pierce, Rockford, USA) sichtbar gemacht.

[0102] Die Fig. 5 und 6 zeigen, dass es unter Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren zu keiner signifikanten Änderung der steady state Mengen an intrazellulärem PreS-(Fig. 5) und Core-Protein (Fig. 6) kommt. Lediglich bei der höchsten Konzentration von 10 microM PI ist eine geringfügige Reduktion an viralen Proteinen zu beobachten. Es ist bemerkenswert, dass zum Beispiel 10 nanoM PI überhaupt keinen Effekt auf die intrazelluläre virale Proteinexpression hat, aber immer noch einen deutlichen Effekt auf die Freisetzung ausübt.

[0103] In der Summe dieser Ergebnisse wird festgestellt, dass die Behandlung von chronisch infizierten primären Entenhepatozyten mit PI bis zu einer Konzentration von 10 microM über einen 48 h Behandlungszeitraum nur einen geringen oder gar keinen Einfluss auf die intrazelluläre Expression von Core- und Pre-S-Antigen hat, während die Freisetzung von viralen Partikeln jedoch drastisch reduziert ist. Darüber hinaus kann geschlussfolgert werden, dass die Vitalität und Proteinsynthese der primären Entenhepatozyten nicht wesentlich beeinträchtigt sind.

[0104] Um die Wirksamkeit der Behandlung von primären Entenhepatozyten mit Proteasom-Inhibitoren hinsichtlich der Blockade des UPS zu demonstrieren, wurden jeweils 20 microl der Zelllysate in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen, für 5 min gekocht, und in 6% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert und mit polyklonalen Kaninchen-anti-Ubiquitin-Antikörpern (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert und mittels nachfolgender ECL-Reaktion sichtbar gemacht. Die Fig. 7 zeigt ab einer Konzentration von 1 microM PI eine deutliche Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen relativ zu den niedermolekularen Banden. Es ist bekannt, dass lang andauernde Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren zu einer Veränderung sowohl der Proteinsynthese als auch des -musters führt. Diese ist deutlich anhand des veränderten Profils der niedermolekularen Proteine in den PI-behandelten Zellen zu erkennen und daher ein weiterer Beleg für die Wirksamkeit von PI zur effizienten Blockierung der Proteasom-Aktivität in primären Hepatozyten.

Beispiel 2

Proteasom-Inhibitoren blockieren die Produktion/Freisetzung von infektiösen Viren aus chronisch DHBV infizierten primären Hepatozyten

[0105] In den vorhergehenden Experimenten (Beispiel 1) wurde festgestellt, dass eine Inhibition der zellulären Proteasom-Aktivität die Freisetzung von DHBV-Proteinen wesentlich einschränkt, ohne jedoch signifikant die intrazelluläre virale Proteinexpression zu beeinflussen. Es blieb daher weiterhin zu klären, ob die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren nicht nur die Sekretion von Viruspartikeln um einen

Faktor von ca. 4 reduziert, sondern darüber hinaus auch noch einen negativen Effekt auf den Grad der Infektiosität der Nachkommenviren hat. Es wurde daher untersucht, ob und wie viele infektiöse Virionen in den Überständen von 5 Proteasom-Inhibitoren-behandelten chronisch DHBV infizierten primären Entenhepatozyten enthalten sind im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. Hierzu wurden ca. 7 Tage alte, chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozyten, deren Herstellung bereits unter Beispiel 1 beschrieben ist, für 48 h mit 10 microM PI behandelt. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände, wie bereits unter Beispiel 1 beschrieben, geerntet und für die Neuinfektion von primären Leberzellen benutzt. DHBV-negative, primäre Entenhepatozyten wurden wie im Beispiel 1 beschrieben präpariert und mit einer Dichte von ca. 8×10^5 /well in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Eine Woche nach der Ausplattierung wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml zellfreier Zellkulturüberstände von PI-behandelten beziehungsweise nicht behandelten DHBV-positiven Zellkulturen infiziert. Als 10 Kontrolle wurde eine parallele Kultur mit 20 microl DHBV-positivem Serum/Well infiziert (entspricht einer multiplicity of infection – MOI – von 20). Nach 16 h Inkubation bei 37°C wurde das Virus-Inokulum entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in neuem Medium weiterkultiviert. Die Etablierung einer produktiven Infektion wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz und SDS-PAGE für die viralen Proteine Core und PreS nach 2.5 Tagen bestimmt. Für Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml einer eiskalten 1 : 1-Mischung aus Methanol und Aceton für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit dem ersten Antikörper, Kaninchcn-anti-PreS (Bremer et al., 2001) in einer Verdünnung von 1 : 800 in PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte 20 eine 30-minütige Inkubation mit dem Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen, Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (4 microg/ml) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt. Die Fluoreszenzen wurden mit einem inversen Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) analysiert und mit Hilfe des Bildverarbeitungssystems Openlab (Improvision, Coventry, UK) prozessiert. Die Immunfluoreszenzbilder zeigen, dass in Zellkulturen, welche mit DHBV aus Zellkulturüberständen von mit 25 PI-behandelten Zellen infiziert wurden, keine PreS-exprimierende Zelle nachgewiesen werden konnte (Fig. 8, PreS), während ca. 1–5% der Hepatozyten in den Kulturen, welche mit Überständen von unbehandelten Zellen inkubiert wurden, eindeutig PreS-positiv und damit infiziert waren (Fig. 9, PreS). Als Nachweis für die Anzahl der auf dem Objektträger vorhandenen Zellen wurde deren Zellkerne mit Hoechst gefärbt und dieses Bild mit dem Fluoreszenzbildern überlagert (für behandelte Zellen, siehe Fig. 8 und für unbehandelte Zellen, siehe Fig. 9, jeweils Hoechst und PreS merge).

[0106] Für Western Blotanalysen wurden die Zellen aus parallelen Kulturen direkt mit 200 microl Laemmli-Buffer lysiert und für 5 min gekocht. Jeweils 20 microl der Zelllysate wurden in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen PreS- (Fernholz et al., 1993) oder gegen Core-Protein (Bremer et al., 2001) inkubiert und Proteine mit ECL sichtbar gemacht. Die Blots zeigen deutlich sichtbare Signale für PreS- (Fig. 10, Spur 3) und Core-Protein (Fig. 11, Spur 3) in den Extrakten von Zellen, die mit DHBV aus nicht behandelten Zellen infiziert wurden, dagegen so gut wie keinen Hinweis für die Expression von DHBV-Proteine in Zellen, welche mit Zellkultur-Überständen von PI 30 35 40 45 50 55 60 65

behandelten Zellen inkubiert wurden (Fig. 10, Spur 4 bzw. Fig. 11, Spur 4).

Beispiel 3

Proteasom-Inhibitoren blockieren sowohl die frühe Phase einer akuten DHBV-Infektion als auch die nachfolgende Sekundärinfektion und damit deren Ausbreitung in Zellkulturen

[0107] In den vorhergehenden Ausführungsbeispielen wurde gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren nicht nur die Sekretion neuer viraler und subviraler Partikel aus chronisch DHBV infizierten Hepatozyten hemmen, sondern darüber hinaus auch die Infektiosität der wenigen, noch freigesetzten DHBV-Virionen praktisch vollkommen blockieren. Daher kann angenommen werden, dass Proteasom-Inhibitoren die Ausbreitung einer bereits etablierten Infektion (durch freigesetzte Nachkommensviren aus bereits infizierten Hepatozyten) auf nicht infizierte Zellen, die so genannte Sekundärinfektion, verhindern können. Dieser Effekt wurde in folgendem Experiment untersucht: Primäre Hepatozyten aus DHBV-negativen Tieren wurden exakt nach der im Beispiel 1 beschriebenen Methodik präpariert. 4 Tage nach Aussaat der Zellen in 12 Well-Mikrotiterplatten (ca. 8×10^5 Zellen/Well) wurde das Kulturmedium erneut gewechselt und die Zellen mit einer MOI von 20 infiziert. Nach 16 h Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in neuem Medium für weitere 3 Tage weiter kultiviert. In diesem Zeitraum findet nur die Etablierung der Primärinfektion statt. Danach wurde das Medium erneut gewechselt, und zu parallelen Kulturen wurden jeweils 1 microM der Proteasom-Inhibitoren PI, Eponemycin oder Exopoxomicin zugegeben und die Kulturen für weitere 3 Tage inkubiert. Entsprechend dem oben beschriebenen Effekt von Proteasom-Inhibitoren sollten die behandelten primär infizierten Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen sowohl eine geringere Expression der viralen Antigene zeigen als auch (wegen der Blockade der Sekundärinfektion) die Zahl der infizierten Zellen deutlich verringert sein. Um dies zu prüfen, wurden die Zellkulturen fixiert und die Zahl der Core-positiven Zellen und dessen Expressionshöhe auf Einzelzellebene durch indirekte Immunfluoreszenz mit anti-Core Antikörpern bestimmt. In der Tat hemmen die eingesetzten Proteasom-Inhibitoren sowohl die Erhaltung einer bereits etablierten, produktiven Infektion (offensichtlich in der Fig. 12 (Core, PI, Epone- und Exopoxicin)), welches an der sehr viel geringeren Anzahl von Core-positiven Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (Fig. 12, unbehandelt) ablesbar ist. Zum Vergleich sind die Phasenkontrastaufnahmen (Fig. 12, Phako) als auch die Hoechstfärbung (Fig. 12, Hoechst) der gleichen Bildausschnitte gezeigt.

[0108] Um herauszufinden, ob Proteasominhibitoren die Freisetzung des sogenannten e-Antigens hemmen, das für die Etablierung einer chronischen Infektion notwendig ist (Chen et al., 1992), wurde die Menge des e-Antigens im Medium mittels Immunoblot bestimmt und mit dem ebenfalls getesteten PreS-Antigen korreliert. Hierzu wurden die Proteine von je einem Aliquot der Zellkulturmiedien (20 microl) in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und die e- und PreS-Antigenproteine durch Kaninchenantikörper gegen Core-Protein (kreuzreagierend mit dem e-Antigen, Bremer et al., 2001) bzw. PreS durch ECL nachgewiesen. Wie in Fig. 13 und 14 zu sehen, führt die Proteasominhibitor-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Menge des e- bzw. des PreS-Antigens im Medium. Die Coomasieblaufärbung der Gele ergab, dass die Proteasominhibitoren spezifisch nur die Sekretion der ge-

steten viralen Proteine hemmen, jedoch nicht die bestimmter zellulären Proteine.

[0109] Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren zu einer drastischen Reduktion der Freisetzung des e- und PreS-Antigens führt.

[0110] Um zu zeigen, dass die geringere Zahl DHBV-positiver Zellen in den mit Proteasom-Inhibitoren behandelten Zellen in der Tat durch Blockade der Sekundärinfektion bedingt ist, wurden die Zellen 3 Tage nach Infektion für 3 Tage mit 100 microg/ml Suramin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) behandelt. Suramin, eine in vivo sehr toxische Substanz, blockiert bekanntlich die Sekundärinfektion, ohne dabei mit der bereits etablierten primären DHBV-Infektion zu interferieren (Pugh et al., 1994). Andererseits sind die mit Suramin vorbehandelten Hepatozyten resistent gegenüber einer DHBV-Infektion. Dementsprechend ergibt sich 3 Tage nach der Primärinfektion in den mit Suramin behandelten Zellen (Fig. 15, Suramin 3d post Infektion) eine ähnlich intensive Core-Färbung von Zellen wie in den unbehandelten Kulturen (Fig. 15, unbehandelt), jedoch ist die Zahl der Core-exprimierenden Zellen sehr stark verringert. Die Vorbehandlung der Zellen mit Suramin blockiert wie erwartet die Etablierung der primären Infektion vollständig (Fig. 15, Suramin 2 h prä Infektion). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (Fig. 15, Phako) und Höchstfärbungen (Fig. 15, Höchst) der gleichen Bildausschnitte sind zum Vergleich ebenfalls gezeigt.

[0111] Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass Proteasom-Inhibitoren, ähnlich wie Suramin, durch Blockade der Sekundärinfektion die Ausbreitung der DHBV-Infektion verhindern können. Darüber hinaus und im Gegensatz zu Suramin führt die Hemmung der Proteasom-Aktivität additiv zu einer Reduktion der viralen Genexpression in primär infizierten Hepatozyten. Die Effekte von Proteasom-Inhibitoren sowohl auf die Primär- als auch auf die Sekundärinfektion korrelieren eng mit dem Potential der eingesetzten unterschiedlichen Substanzklassen.

[0112] Insgesamt demonstrieren diese Experimente, dass Proteasom-Inhibitoren sowohl die Etablierung als auch die Persistenz einer primären Infektion hemmen. Darüber hinaus verhindern sie die Ausbreitung der primären DHBV-Infektion durch Blockierung der Nachkommensviren. Damit sind Proteasom-Inhibitoren geeignete Substanzen, um die Ausbreitung einer HBV Infektion *in vivo* zu blockieren.

Beispiel 4

Proteasom-Inhibitoren induzieren Hypophosphorylierung des Core-Proteins in chronisch DHBV infizierten primären Hepatozyten

[0113] In den vorhergehenden Ausführungsbeispielen wurde gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren nicht nur die Sekretion neuer viraler und subviraler Partikel aus Hepatozyten hemmen, sondern darüber hinaus auch die Infektiosität der wenigen, noch freigesetzten DHBV-Virionen praktisch vollkommen blockieren. Ein Grund für die massiv reduzierte Infektiosität von DHBV könnte auf die Proteasom-Inhibitoren-vermittelte posttranskriptionale Modifikationen seiner strukturellen Komponenten beruhen. Zum Beispiel würde eine Änderung des Phosphorylierungsgrades des Core-Proteins zu einem Defekt in der Destabilisierung der "incoming Cores" in der frühen Phase der Infektion führen.

[0114] Um den Einfluss der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren auf das intrazelluläre Phosphorylierungsmuster des Core-Proteins zu testen, wurden ca. 7 Tage alte, chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozyten für 48 h

mit steigenden Konzentrationen von PI 10 microM, 3 microM, 1 microM und 10 nanoM behandelt. Abschließend wurden die Zellen lysiert (50 mM Tris·HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Natrium-Deoxycholat, komplementiert mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail) (Complete, Roche, Mannheim)). Die Zelllysate wurden von der unlöslichen Fraktion durch Zentrifugation (14 krpm, 10 min, 4°C) getrennt, und jeweils 20 microl der geklärten Fraktion wurden nach Zugabe von Laemmli-Buffer durch Kochen für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Lysate in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Semi-Dry Transfertechnik (Biorad, München, Deutschland) auf Nitrozellulose elektro-transferiert. Die Membranen wurden mit 5% Magermilch geblockt und nach Waschen mit TBS mit Antikörpern gegen Core-Protein (Bremer et al., 2001) inkubiert (Fig. 16). Die markierten viralen Proteine wurden anschließend mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Die Fig. 16 zeigt, dass in allen behandelten Proben das Verhältnis von hyperphosphoryliertem Core- zu weniger oder nicht phosphoryliertem Core-Protein zugunsten des letzteren verschoben ist. Es ist bemerkenswert, dass zum Beispiel 10 nanoM PI überhaupt keinen Effekt auf die intrazelluläre virale Proteinexpression hat (Fig. 5, Spur 6; Fig. 6, Spur 6), aber immer noch einen deutlichen Effekt auf den Phosphorylierungsgrad des Core-Proteins (Fig. 16, Spur 6) ausübt.

[0115] Im Ergebnis dieser Untersuchung wird daher festgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren zu einer Veränderung in der Modifizierung des Nukleokapsidproteins führen und dies wahrscheinlich die mechanistische Grundlage für die reduzierte Infektiosität der aus den mit Proteasom-Inhibitoren behandelten Zellen sekretierten DHBV-Viren ist.

Beispiel 5

Primäre Entenhepatozyten sind relativ resistent gegenüber den toxischen Effekten von Proteasom-Inhibitoren

[0116] Da das UPS in zahlreichen zellulären Mechanismen involviert ist, kann eine vollständige Inhibition der Proteasom-Aktivität auf längere Zeit nicht mit der Vitalität einer Zelle vereinbart werden. Jedoch zeigen verschiedene Zelltypen unterschiedliche Sensitivität gegenüber der toxischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren. Dabei ist auffällig, dass sich rasch teilende und/oder aktivierte Zellen in der Regel eine höhere Sensitivität gegenüber Proteasom-Inhibitoren besitzen im Vergleich zu ruhenden und/oder nicht aktivierte Kulturen. Darauf beruht die antineoplastische Wirkung der Proteasom-Inhibitoren. Um die Toxizität von Proteasom-Inhibitoren in primären Entenhepatozyten im Vergleich zu humanen transformierten Hepatoblastoma-Zellen zu bestimmen (siehe Beispiel 6), wurden Dosis-Limitierungsstudien mit Proteasom-Inhibitoren durchgeführt. Hierzu wurden primäre Hepatozyten, wie im Beispiel 1 bereits beschrieben, aus Entenembryonen gewonnen, mit einer Dichte von ca. 8×10^5 /well in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und für 7 Tage kultiviert. Die Vitalität der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Parallel-Kulturen wurden mit steigenden Dosen an PI (jeweils 10 microM, 3 microM, 1 microM, 10 nanoM und 1 nanoM) für 48 h behandelt. Etwa alle 12 h wurden die Zellen hinsichtlich Morphologie und Vitalität lichtmikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurde deren Funktionalität mittels Fluoreszenzvitalfärbung mit Fluoreszeindiacetat (FDA) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bestimmt (Yagi et al., 2001). FDA wird aktiv und präferenziell von Hepatozyten aufgenommen und dort mittels einer Lipase, die exklusiv in Hepatozyten exprimiert wird, in Fluoreszein konvertiert und bewirkt die Fluoreszenzfärbung des Zytoplasmas, ein Zeichen für die Funkti-

onsfähigkeit und Vitalität von Hepatozyten. In diesem Experiment wurden die behandelten und unbehandelten primären Entenhepatozyten mit FDA-haltigem Williams E Medium (5 microg/ml) für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die Vitalität der Hepatozyten mittels eines inversen Epifluoreszenzmikroskops beurteilt und mit dem Bildverarbeitungssystems Openlab weiter prozessiert. Fig. 17 zeigt, dass alle Kulturen, die mit bis zu 1 microM PI behandelt wurden, weder eine morphologische Veränderung noch Hinweise auf eingeschränkte Vitalität zeigten, d. h. nicht zu unterscheiden waren von nicht behandelten Hepatozyten (Fig. 18). Bei Behandlung mit 3 microM und 10 microM der PI wurden in den Nicht-Hepatozyten, die in Kulturen von primären Hepatozyten immer mit vorliegen, deutliche morphologische Veränderungen wie zum Beispiel abgerundete Zellen und intrazelluläre Vakuolenbildung beobachtet. Die Vitalität der Hepatozyten dagegen war nicht verändert gemäß visueller Beurteilung und der Fluoreszenzintensität. Erst ab einer Konzentration von 10 microM PI traten erste Zeichen einer toxischen Wirkung auch in Hepatozyten auf (Fig. 17). Ähnliche Ergebnisse wurden mit unterschiedlichen PI, wie zum Beispiel Lactacystin und Epoxomicin, beobachtet.

[0117] Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass primäre Entenhepatozyten relativ hohe Konzentrationen von bis zu ca. 10 microM Proteasom-Inhibitor tolerieren können, während proliferierende Leberkarzinoma-Zellen (siehe Beispiel 12) und andere proliferierende Zellen in der Hepatozyten-Kultur sehr viel sensibler gegenüber der toxischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren sind (Fig. 1, 17, 19, 20 und 21).

Beispiel 6

35 Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf das Zellwachstum und die Zellvitalität der humanen Hepatoma-Zellen, HepG2

[0118] Human Hepatoma-Zelllinie HepG2 wurde in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) (GIBCOBRL, Paisley, Scotland) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (Biochrom, Berlin, Deutschland), 2 mM L-Glutamin (GIBCOBRL, Paisley, Scotland), 100 Einheiten ml^{-1} Penicillin und 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C kultiviert. Nach Passagierung mit 0.25% Trypsin und 1 mM EDTA (GIBCOBRL, Paisley, Scotland) wurden die Zellen in einer Dichte von 0.5×10^6 /Well in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät. 24 h später wurde das Medium gewechselt, und die Zellen wurden mit PI, Eponemycin und Epoxomicin, jeweils in Konzentrationen von 10 microM, 3 microM und 1 microM sowie 100 nanoM, 10 nanoM, und 1 nanoM für 48 h behandelt und anschließend mit Trypanblaufärbung auf ihre Vitalität getestet und mittels Lichtmikroskopie morphologisch begutachtet. Bis zu einer Konzentration von 10 nanoM war keiner der eingesetzten Proteasomeinhibitoren toxisch und anti-proliferativ (Fig. 19, 20 und 21). Toxische Erscheinungen traten ab einer Konzentration von 100 nanoM bei PI (Fig. 19) und Epoxo- (Fig. 21) auf, während Eponemycin (Fig. 20) noch gut vertragen wurde. Bei 1 microM und höher waren alle getesteten Substanzen hochtoxisch (Fig. 19, 20 und 21). Dabei wurden Effekte wie Abrundung und Ablösung der Zellen, Degeneration sowie Apoptose beobachtet.

[0119] Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass proliferierende Leberkarzinoma-Zellen sehr viel sensibler gegenüber der toxischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren sind, während primäre Entenhepatozyten relativ hohe Konzentrationen von bis zu ca. 10 microM Proteasom-Inhibitoren tolerieren können (Fig. 17, 19, 20 und 21).

Beispiel 7

Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die Sekretion von HBV-spezifischen Antigenen in humanen Hepatoma-Zelllinien

[0120] Primäre humane Hepatozyten wurden wie beschrieben aus menschlichen Lebern gewonnen (Dandri et al., 2001) und mit humanem HBV infiziert, welche aus dem Medium von HepG2.2.15-Zellen, die infektiöses humanes Hepatitis-B-Virus produziert (Seils et al., 1987), geerntet wurden. Parallel Kulturen der HepG2-Zellen wurden für 2 Tage mit PI behandelt, oder nicht behandelt. Die HepG2-Zellen wurden vor der Behandlung mit replikationskompetenten HBV-Genomen wie beschrieben (Kalinina et al., 2001) transfiziert. Im Gegensatz zu zahlreichen HBV Core-positiven primären Hepatozyten (analysiert durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit anti-core Antikörpern), welche auf eine erfolgreiche Infektion von primären humanen Hepatozyten mit Viren aus den nicht behandelten Zellen schließen lassen, wurden keine Core-positiven primären humanen Hepatozyten nach Infektion mit Nachkommenviren aus Proteasominhibitorbehandelten HepG2 Zellen gefunden.

[0121] Im Ergebnis dieses Experimentes kann damit festgestellt werden, dass Proteasominhibitor-Behandlung ähnlich der Wirkung auf DHBV ebenfalls die Freisetzung und Infektiosität von HBV blockiert.

Legende zu den Figuren

Fig. 1

Nichtparenchymale Zellen einer primären Hepatozytenkultur sind sensitiver gegenüber den toxischen Effekten von Proteasom-Inhibitoren

[0122] Gezeigt ist eine primäre Hepatozytenkultur, welche mit 1 microM PI für 72 h behandelt worden ist. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit Hoechst gefärbt (blau). Die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme ist gegenübergestellt. Das obere Phasenkontrastbild zeigt eine ehemalige Insel aus Nicht-Hepatozyten, während das untere die gefärbten Kerne desselben Bildausschnitts wiedergibt. Die kleinen Pfeile zeigen auf die apoptotischen nicht-parenchymalen Zellen, während der Blockpfeil auf eine intakte, kleine Hepatozytenkolonie zeigt.

Fig. 2

Proteasom-Inhibitoren hemmen konzentrationsabhängig die Freisetzung von PreS-haltigen Viruspartikeln in chronisch DHBV infizierten primären Entenhepatozyten

[0123] Eine 7 Tage alte, chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozytenkultur wurde für 48 h mit steigenden Konzentrationen von PI (1 nanoM, 1 microM und 10 microM) behandelt bzw. nicht behandelt. 200 microl der jeweiligen Überstände wurden aufgedottet. Die Menge der freigesetzten viralen Partikeln wurde mittels eines PreS-Antigen spezifischen Dot-Blots bestimmt.

Fig. 3

Proteasom-Inhibitoren hemmen konzentrationsabhängig die Freisetzung von PreS-haltigen Virusartikeln in chronisch DHBV infizierten primären Entenhepatozyten

[0124] Eine 7 Tage alte, chronisch DHBV infizierte pri-

märe Entenhepatozytenkultur wurde für 48 h mit steigenden Konzentrationen von PI (1 nanoM, 10 nanoM, 1 microM, 3 microM und 10 microM) behandelt bzw. nicht behandelt. Die 5 microliter der jeweiligen Überstände wurden in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Darstellung der PreS-Protein-Banden (p36 und p28) erfolgte durch Western Blot.

Fig. 4

10 Proteasom-Inhibitoren hemmen konzentrationsabhängig die Freisetzung von DNA-haltigen Viruspartikeln in chronisch DHBV infizierten primären Entenhepatozyten (PEH)

[0125] Eine 7 Tage alte chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozytenkultur wurde für 48 h mit steigenden Konzentrationen von PI (10 nanoM, 1 microM, 3 microM und 10 microM) behandelt bzw. nicht behandelt, der Überstand gesammelt und durch Zentrifugation geklärt. Danach wurde der Überstand auf Nitrozellulose aufgedottet und die Membran mit einer ³²P-markierten DHBV-DNA-Sonde hybridisiert und autoradiographiert. Dots von nicht infizierten PEHs sind mit - gekennzeichnet, dots von infizierten Hepatozyten mit +. Die Standardisierung des DNA-Dot-Blots erfolgte durch Auftragung von bekannten Konzentrationen an klonierter DHBV-DNA (Standard DHBV-DNA).

Fig. 5

30 Proteasom-Inhibitoren haben keinen nennenswerten Einfluss auf die intrazelluläre PreS-Genexpression

[0126] 7 Tage alte chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozytenkulturen (PEHs) wurden für 48 h mit steigenden Dosen PI behandelt. Zellysate wurden in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und zum Nachweis von PreS-Antigen geblotet. In Spuren 1 und 2 sind unbehandelte, nicht infizierte (-PEHs) bzw. chronisch DHBV infizierte Hepatozyten (+PEHs) aufgetragen. Spuren 3 bis 7 entsprechen Aufträgen von mit unterschiedlichen Dosen an PI-behandelten Zellen. p36 und p28 entsprechen dem PreS-Protein voller Länge bzw. einem Degradationprodukt desselben.

Fig. 6

45 Proteasom-Inhibitoren haben keinen nennenswerten Einfluss auf die Core-Expression

[0127] 7 Tage alte chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozytenkulturen wurden für 48 h mit steigenden Dosen PI behandelt. Zellysate wurden in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und das Core-Protein (Pfeil) durch indirekte Chemolumineszenz dargestellt. In Spuren 1 und 2 sind nicht behandelte DHBV-negative (-PEHs) bzw. chronisch DHBV infizierte Hepatozyten (+PEH) aufgetragen. Spuren 3 bis 7 entsprechen Aufträgen von mit unterschiedlichen Dosen an PI-behandelten Zellen.

Fig. 7

60 Akkumulation poly-ubiquitinierter Proteine in mit Proteasom-Inhibitoren behandelten primären Entenhepatozyten

[0128] Eine Woche alte, chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozyten wurden für 48 h mit steigenden Konzentrationen von PI (Spuren 2 bis 6) behandelt. Als Kontrolle wurden DHBV infizierte (+PEHs, Spur 1) und virusfreie Zellen ohne PI kultiviert (-PEHs, Spur 7). Anschließend wurden Zellysate in 6% SDS-PAGE aufgetrennt

und mono- sowie polyubiquitinierte Proteine mittels Kaninchen-anti-Ubiquitin nachgewiesen. Rechts ist die jeweilige Position der Proteinmarkerbanden in kDa angegeben. Polyubi. zeigt die hochmolekularen poly-ubiquitinierten Proteine an.

Fig. 8

Überstände der mit Proteasom-Inhibitoren behandelten chronisch DHBV infizierten primären Entenhepatozyten-Kulturen (PEH) enthalten keine infektiösen Nachkommenviren

[0129] 7 Tage alte chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozyten wurden für 48 h mit 10 microM PI behandelt und anschließend der geerntete Zellkulturüberstand für die Neuinfektion von DHBV-negativen PEH-Kulturen benutzt. Nach 16 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand entfernt, die Zellen gewaschen und mit neuem Medium versorgt. 60 h nach der Infektion wurden die Zellen gewaschen und fixiert. Abschließend erfolgte die Färbung der Zellen für PreS (grün). Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mittels Hoechstfärbung (blau). Der obere bzw. untere Bereich der Figur ist eine niedrige bzw. höhere Vergrößerung desselben Bildausschnittes.

Fig. 9

Nachkommenviren aus chronisch DHBV infizierten primären Entenhepatozyten sind infektiös

[0130] Zellkulturüberstände einer 7 Tage alten chronisch infizierten primären Entenhepatozytenkultur wurde gesammelt und für die Neu-Infektion von DHBV-negativen primären Entenhepatozyten benutzt. Nach 16 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand entfernt, die Zellen gewaschen und mit neuem Medium versorgt. 60 h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert. Abschließend erfolgte die Färbung der Zellen für PreS (grün). Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mittels Hoechstfärbung (blau). Der untere Bereich der Figur ist die höhere Vergrößerung desselben oben gezeigten Bildausschnittes.

Fig. 10

Überstände der mit Proteasom-Inhibitoren behandelten DHBV infizierten Hepatozyten enthalten keine infektiösen Nachkommenviren

[0131] 7 Tage alte chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozyten (PEH) wurden für 48 h mit 10 microM PI behandelt und anschließend der Überstand gesammelt, durch Zentrifugation geklärt und für de novo Infektion von PEHs benutzt. Nach 16 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand entfernt, die Zellen gewaschen und mit neuem Medium versorgt. 60 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Darstellung der PreS-Proteinbanden im Western Blot erfolgte durch Western Blot. In Spuren 1 und 2 sind DHBV-negative bzw. chronisch DHBV infizierte PEH aufgetragen. Spur 3 und 4 entsprechen PEHs, welche mit Überständen aus nicht behandelten bzw. PI-behandelten Kulturen infiziert wurden. Aufgetragen in Spur 5 sind PEHs, welche mit einer MOI von 20 infiziert wurden.

Fig. 11

Überstände der mit Proteasom-Inhibitoren behandelten DHBV infizierten Hepatozyten enthalten keine infektiösen Nachkommenviren

[0132] 7 Tage alte chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozyten (PEH) wurden für 48 h mit 10 microM PI behandelt und anschließend der Überstand gesammelt, 10 durch Zentrifugation geklärt und für Neuinfektion von PEH-Kulturen benutzt. Nach 16 h Inkubation wurde der Überstand entfernt, die Zellen gewaschen und mit neuem Medium versorgt. 60 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und das Lysat durch 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. 15 Die Darstellung des Core-Proteins erfolgte durch Westernblot. In Spuren 1 und 2 sind DHBV-negative bzw. chronisch DHBV-infizierte PEH aufgetragen. Spur 3 und 4 entsprechen PEH, welche mit Überständen aus nicht behandelten bzw. PI-behandelten Kulturen infiziert wurden. Aufgetragen 20 in Spur 5 sind PEHs, welche mit einer MOI von 20 infiziert worden sind.

Fig. 12

25 Hemmung der Primär- und Sekundärinfektion durch Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren von primären Entenhepatozyten (PEH) infiziert mit DHBV

[0133] 4 Tage alte Kulturen von PEH wurden mit einer 30 MOI von 20 für 16 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im neuen Medium für weitere 3 Tage kultiviert. Am 3. Tag nach der Infektion wurden die Zellen entweder ohne Proteasom-Inhibitoren kultiviert (unbehandelt) oder mit jeweils 1 microM Eponemycin, Epoxomicin 35 oder PI für weitere 3 Tage behandelt. Am 6. Tag der Infektion wurden die Zellen gewaschen und fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen für Core-Protein (grün). Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt (blau). Die Phasenkontrastaufnahmen der jeweiligen Bildausschnitte sind 40 ebenfalls zu sehen.

Fig. 13

45 Proteasom-Inhibitoren hemmen die Freisetzung des e-Antigens in DHBV infizierten primären Entenhepatozyten

[0134] 4 Tage alte primäre Entenhepatozyten (PEH) wurden mit einer MOI von 20 für 16 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im neuen Medium für 50 weitere 3 Tage kultiviert. Am 3. Tag nach der Infektion wurden die Zellen mit jeweils 1 microM PI (Spur 3) Epoxomicin (Spur 4), Eponemycin (Spur 5) für weitere 3 Tage behandelt. Am 6. Tag nach der Infektion wurde der Überstand gesammelt, durch Zentrifugation geklärt. Ein Aliquot der 55 Überstände wurde in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Darstellung der PreCore-Protein-Banden (Pfeile) erfolgte durch indirekte Chemolumineszenz. In Spuren 1 und 2 sind nicht behandelte negative bzw. chronisch DHBV infizierte PEH, in Spuren 3 PI, 4 Epoxomicin und 5 Eponemycin behandelte, DHBV infizierte PEH aufgetragen.

Fig. 14

Proteasom-Inhibitoren hemmen die Freisetzung des PreS-Antigens in DHBV infizierten primären Entenhepatozyten

[0135] 4 Tage alte Hepatozyten-Kulturen wurden mit einer MOI von 20 für 16 h infiziert. Anschließend wurden die

Zellen gewaschen und im neuen Medium für weitere 3 Tage kultiviert. Am 3. Tag nach der Infektion wurden die Zellen mit jeweils 1 microM PI (Spur 3), Epoxomicin (Spur 4) und Eponemycin (Spur 5) für weitere 3 Tage behandelt. Am 6. Tag nach der Infektion wurde der Überstand gesammelt und in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Darstellung der PreS-Protein-Banden (p36 und p28) erfolgte im Western Blot. In Spuren 1 und 2 sind nicht behandelte negative bzw. chronisch DHBV infizierte PEH aufgetragen, DHBV infizierte PEH wurden aufgetragen in Spur 3 (PI), in Spur 4 (Epoxomicin) und in Spur 5 (Eponemycin).

Fig. 15

Suramin hemmt sowohl die primäre als auch die sekundäre DHBV-Infektion in primären Entenhepatozyten

[0136] 4 Tage alte PEH wurden 2 h vor der Infektion mit 100 microg/ml Suramin behandelt (Suramin Präinfektion) oder zunächst unbehobtelt belassen (kein Suramin und Suramin 3d post Infektion). Anschließend wurden alle Zellen mit einer MOI von 20 infiziert. Nach 16 h Inkubation wurden die Kulturen gewaschen und mit neuem Medium weiter kultiviert. Am 3. Tag nach der Infektion wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen in "kein Suramin" und "Suramin prä Infektion" wurden für weitere 3 Tage ohne und die Zellen in "Suramin 3d post Infektion" mit 100 microg/ml Suramin behandelt. Am 6. Tag der Infektion wurden die Zellen gewaschen und fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen für Core-Protein (Core). Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt (Hoechst). Die Phasenkontrastaufnahmen der jeweiligen Bildausschnitte sind ebenfalls gezeigt (Phasenkontrast).

Fig. 16

Proteasom-Inhibitoren induzieren die Hypophosphorylierung des intrazellulären Core-Proteins in chronisch DHBV infizierten primären Hepatozyten

[0137] 7 Tage alte chronisch DHBV infizierte primäre Entenhepatozytenkulturen würden für 48 h mit steigenden Dosen PI behandelt und anschließend lysiert. Die Lysate wurden in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und das Core-Protein durch indirekte Chemolumineszenz dargestellt. In Spuren 1 und 2 sind nicht behandelte negative bzw. chronisch DHBV infizierte PEH aufgetragen. Spuren 3 bis 6 entsprechen mit angegebenen Dosen an PI-behandelten Zellen. CorePP entspricht hyperphosphoryliertem und CoreP hypophosphoryliertem Core-Protein.

Fig. 17

Behandlung von primären Entenhepatozyten mit Proteasom-Inhibitoren schränkt nicht deren Vitalität und Funktionalität ein

[0138] 7 Tage alte primäre Zellkulturen aus chronisch DHBV infizierten Entenlebern wurden 48 h lang mit steigenden Konzentration von PI (10 microM, 3 microM und 1 microM) behandelt. Am Ende dieser Behandlungsperiode wurden die Zellen für 5 min mit FDA-haltigem Williams E Medium (5 microg/ml) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die erfolgreiche Konversion des FDA in Fluoreszin in Hepatozyten mittels eines Epifluoreszenzmikroskops beurteilt. Zellen mit grüner Färbung im Zytoplasma wurden als vital und funktionell angenommen. Die jeweiligen Fluoreszenz- (Fluoreszin) und

die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (Phasenkontrast) mit der Angabe der benutzten PI-Dosis werden gezeigt. Die weißen Pfeile mit Spitze zeigen beispielhaft auf Nester von nichtparenchymalen Zellen, welche im Vergleich zu Hepatozyten keine bzw. nur beschränkte FDA-Aufnahme und Konversion zeigen.

Fig. 18

10 Aufnahme und Konversion des Vitalmarkers Fluoreszindiacetat in Fluoreszin erfolgt bevorzugt in Hepatozyten

[0139] Eine Woche alte primäre Zellkulturen aus chronisch DHBV infizierten Entenlebern wurden für 5 min mit FDA-haltigem Williams E Medium (5 microg/ml) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die erfolgreiche Konversion des FDA in Fluoreszin in Hepatozyten mittels eines Epifluoreszenzmikroskops beurteilt. Zellen mit grüner Färbung im Zytoplasma wurden als vital und funktionell angenommen (Fluorescein). Das demselben Bildausschnitt korrespondierende Phasenkontrast ist ebenfalls gezeigt (Phasenkontrast). Die weißen Pfeile mit Spitze zeigen beispielhaft auf Nester von nichtparenchymalen Zellen, welche im Vergleich zu den Hepatozyten keine bzw. nur beschränkte FDA-Aufnahme und Konversion zeigen.

Fig. 19

30 Behandlung von Hepatomazellen (HepG2) mit Proteasom-Inhibitoren schränkt deren Vitalität und Funktionalität ein

[0140] HepG2-Zellen wurden 48 h lang mit steigenden Konzentration (10 microM, 3 microM und 1 microM, 35 100 nanoM, 10 nanoM und 1 nanoM) von PI (Abschnitt A) behandelt. Am Ende dieser Behandlungsperiode wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mit einem Durchlichtmikroskop begutachtet. Zellen mit dunkelblauer Färbung wurden als nicht-vital angenommen. Die jeweilige Konzentration des PI ist in den entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen angegeben.

Fig. 20

45 Behandlung von Hepatomazellen (HepG2) mit Eponemycin schränkt deren Vitalität und Funktionalität ein

[0141] HepG2-Zellen wurden 48 h lang mit steigenden Konzentration (10 microM, 3 microM und 1 microM, 50 100 nanoM, 10 nanoM und 1 nanoM) von Eponemycin (Abschnitt A), behandelt. Am Ende dieser Behandlungsperiode wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mit einem Durchlichtmikroskop begutachtet. Zellen mit dunkelblauer Färbung wurden als nicht-vital angenommen. Die jeweilige Konzentration des Eponemycin ist in den entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen angegeben.

Fig. 21

60 Behandlung von humanen Hepatomazellen, HepG2 mit Epoxomicin schränkt deren Vitalität und Funktionalität ein

[0142] HepG2-Zellen wurden 48 h lang mit steigenden Konzentration (10 microM, 3 microM und 1 microM, 65 100 nanoM, 10 nanoM und 1 nanoM) von Epoxomicin (Abschnitt A) behandelt. Am Ende dieser Behandlungsperiode wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mit einem Durchlichtmikroskop begutachtet. Zellen mit dunkelblauer

Färbung wurden als nicht-vital angenommen. Die jeweilige Konzentration des Epoxomicins ist in den entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen angegeben.

Abkürzungsverzeichnis

- ATP Adenosin-5'-triphosphat
- cccDNA komplett doppelsträngig supergecoiltes DNA-Genom
- CFTR Cystis Fibrosis Transmembran Regulator
- d Tag
- DHBV Enten-Hepatitis-B-Virus
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNA desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
- ECL enhanced chemiluminescence
- EDTA Ethyldiamintetraessigsäure
- ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- PEH Entenhepatozyten
- FDA Fluoresceindiazetat
- h Stunde(n)
- HAART HAART-Therapie (highly active antiretroviral therapy)
- HAV Hepatitis-A-Virus
- HBc Hepatitis-B-Virus E-Antigen
- HBs HBV-Oberflächenprotein
- HBV Hepatitis-B-Virus
- HCC Hepatozelluläres Karzinom
- HCV Hepatitis-C-Virus
- HDV Hepatitis-Delta-Virus
- HEPES N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
- HEV Hepatitis-E-Virus
- HFV Hepatitis-F-Virus
- HGV Hepatitis-G-Virus
- HIV Humanes Immundefizienzvirus
- HPV Humanes Papilloma-Virus
- i. d. R. in der Regel
- IFN Interferon
- IL Interleukin
- kb Kilobasen
- IκB inhibitorischen Faktor IκB
- kDa Kilodalton (Maß für Molekulargewicht)
- Ki inhibitorische Konstante
- LC Lactacystin
- MDa Megadalton
- MHC Major Histocompatibilitäts Komplex
- MOI multiplicity of infection
- NF-κB Transkriptionsfaktor
- NLVS 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leucinyl-L-Leucinyl-L-Leucin-vinyl-sulfon
- nM nano Mol
- ocDNA offen zirkuläre Form der DNA
- PBS Phosphatpuffer, phosphate buffered sahne
- PCR polymerase chain reaction – Polymerase-Kettenreaktion
- PGPH Postglutamyl-Peptid hydrolysierende
- PI Proteasom-Inhibitor(en)
- P-Protein Hepatitis-B-Virus Polymerase-Protein
- Präs/Prs großes Hepatitis-B-Virus Hüllprotein, Präs
- PS ProScript
- PS-341 N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-leuzin-Borsäure
- PS-519 1R-[15,4R,5S]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dion
- PS-273 Morpholin-COHN-(CH-Naphthyl)-COHN-(CH-isobutyl)-B(OH)₂
- PSI N-Carbobenzoxy-Ile-Glu(Obut)-Ala-Leu-H
- RNA Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)

RT Reverse Transkriptase
SDS Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecylsulfate)
SDS-PAGE SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
TBS tris buffered sahne

- 5 TNF Tumornekrosefaktor
- Ub Ubiquitin
- UPS Ub-Proteasom-System
- WB Western Blot
- 10 zLLL Ncarbobenzoxy-L-leucinyl-L-leucinyl-L-leucinal

Literatur

- Adams, J; Behnke, M; Chen, S; Cruickshank, AA; Dick, RL; Grenier, L; Klunder, JM; Ma, Y-T; Plamondon, L; Stein, RL (1998). Potent and selective inhibition of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 333–338.
- Adams, J; Palombella, VJ; Sausville, EA; Johnson, J; De stree, A; Lazarus, DD; Maas, J; Pien, CS; Prakash, S; Elliott, PJ (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 59: 2615–2622.
- Adams, J; Palombella, VJ; Elliot, PJ (2000). Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Investigational New drugs* 18: 109–121.
- Adams, J; Stein, R (1996). Novel inhibitors of the proteasome and their therapeutic use in inflammation. *Annu. Rep. Med. Chem.* 31: 279–288.
- Baldwin, AS (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 649–683.
- Baumeister, W; Walz, J; Zuhl, F; Seemüller, E (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92(3): 367–380.
- Barnes, PJ; Karin, M (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Eng. J. Med.* 336: 1066–1071.
- Bogyo, M; McMaster, JS; Gaczynska, M; Tortorella, D; Goldberg, AL; Ploegh, H (1997). Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the Escherichia coli homolog HsIV by a new class of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6629–6634.
- Bremer, KM; Urban, S; Glass, B; Schauer, H (2001). Envelope protein-mediated down-regulation of hepatitis B virus receptor in infected hepatocytes. *J. Virol.* 75: 143–50.
- Bruns, M; Miska, S; Chassot, S; Will, H (1998). Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J. Virol.* 72: 1462–1468.
- Chen, HS; Kew, MC; Hornbuckle, WE; Tennant, BC; Cote, PJ; Gerin, JL; Purcell, RH; Miller, RL (1992). The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J. Virol.* 66: 5682–5684.
- Ciechanover, A (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell live. *EMBO J.* 17: 7151–7160.
- Coux, O; Tanaka, K; Goldberg, AL (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 801–847.
- Elliott, PJ; Pien, CS; McCormack, TA; Capman, ID; Adams, J (1999). Proteasome inhibition: a novel mechanism to combat asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104: 294–300.
- Elliott, G; O'Hare, P (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88: 223–233.
- Fenteany, G; Standaert, RF; Lane, WS; Choi, S; Corey, EJ; Schreiber, SL (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystein. *Science* 268: 726–731.

- Fernholz, D; Wildner, G; Will, H (1993). Minor envelope proteins of duck hepatitis B virus are initiated at internal pre-S AUG codons but are not essential for infectivity. *Virology* 197: 64–73.
- Frankel, A; Man, S; Elliott, P; Adams, J; Kerbel, RS (2000). Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clinical Cancer Res.* 6: 3719–3728.
- Gaczynska, M; Rock, KL; Goldberg, AL (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365: 264–267.
- Ganem, D (1996). Hepadnaviridae: The viruses and their replication. (in: Fields Virology; B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley eds; Lippincott-Raven press), 1: 2703–2738.
- Gardner, RC; Assinder, SJ; Christie, G; Mason, GG; Markwell, R; Wadsworth, H; McLaughlin, M; King, R; Chabot-Fletcher, MC; Breton, JJ; Allsop, D; Rivett, AJ (2000). Characterization of peptidyl boronic acid inhibitors of mammalian 20S and 26S proteasomes and their inhibition of proteasomes in cultured cells. *Biochem. J.* 346: 447–454.
- Geier, E; Pfeifer, G; Wilm, M; Lucchiari-Hartz, M; Baumeister, W; Eichmann, K; Niedermann, G (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 283: 978–981.
- Glas, R; Bogyo, M; McMaster, JS; Gaczynska, M; Ploegh, HL (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature* 392: 618–622.
- Gunther, S; Fischer, L; Pult, I; Sterneck, M; Will, H (1999). Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv. Virus Res.* 52: 25–137.
- Hanada, M; Sugawara, K; Kaneta, K; Toda, S; Nishiyama, Y; Tomita, K; Yamamoto, H; Konishi, M; Oki, T (1992). Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 45: 1746–1752.
- Harty, RN; Brown, ME; Wang, G; Huibregtse, J; Hayes, FP (2000). A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13871–13876.
- Hershko, A; Ciechanover, A (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425–479.
- Higashitsuji, H; Itoh, K; Nagao, T; Dawson, S; Nonoguchi, K; Kido, T; Mayer, RJ; Aril, S; Fujita, J (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med.* 6: 96–99.
- Hu, Z; Zhang, Z; Doo, E; Coux, O; Goldberg, AL; Liang, TJ; (1999). Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J. Virol.* 73: 7231–40.
- Lightcap, ES; McCormack, TA; Pien, CS; Chau, V; Adams, J; Elliott, PJ (2000). Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin. Chem.* 46: 673–683.
- Meng, L; Kwok, BH; Sin, N; Crews, CM (1999a). Eponemycin exerts its antitumor effect through the inhibition of proteasome function. *Cancer Res.* 59: 2798–2801.
- Meng, L; Mohan, R; Kwok, BH; Elofsson, M; Sin, N; Crews, CM (1999b). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo*, antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(18): 10403–10408.
- Moradpour, D; Grabscheid, B; Kammer, AR; Schmidtke, G; Gröttrup, M; Blum, HE; Cerny, A (2001). Expression of hepatitis C virus proteins does not interfere with major histocompatibility complex class I processing and presentation *in vitro*. *Hepatology* 33: 1282–1287.
- Ott, DE; Coren, LV; Chertova, EN; Gagliardi, TD; Schubert, U (2000).

- Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* 278: 111–121.
- Palombella, VJ; Conner, EM; Fuseler, JW; Destree, A; Davis, JM; Laroux, FS; Wolf, RE; Huang, J; Brand, S; Elliott, PJ; Lazarus, D; McCormack, T; Parent, L; Stein, R; Adams, J; Grisham, MB (1998). Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15671–15676.
- Palombella, VJ; Rando, OJ; Goldberg, AL; Maniatis, T (1994). The ubiquitinproteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78: 773–785.
- Pamer, E; Cresswell, P (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 323–358.
- Patnaik, A; Chau, V; Wills, JW (2000). Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13069–13074.
- Phillips, JB; Williams, AJ; Adams, J; Elliott, P; Tortella, FC (2000). Proteasome inhibitor PS-519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 31: 1686–1693.
- Pugh, JC; Simmons, H (1994). Duck hepatitis B virus infection of Muscovy duck hepatocytes and nature of virus resistance *in vivo*. *J. Virol.* 68: 2487–2494.
- Rehermann, B; Ferrari, C; Pasquinelli, C; Chisari, FV (1996). The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med.* 2: 1104–1108.
- Rivett, AJ; Gardner, RC (2000). Proteasome inhibitors: from *in vitro* uses to clinical trials. *J. Pept. Sci.* 6: 478–488.
- Rock, KL; Gramm, C; Rothstein, L; Clark, K; Stein, R; Dick, L; Hwang, D; Goldberg, AL (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78: 761–771.
- Rock, KL; Goldberg, AL (1999). Degradation of cell proteins and the gereration of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 739–779.
- Schäfer, S; Tolle, T; Lottmann, S; Gerlich, WH (1998). Animal models and experimental systems in hepatitis B virus research. In R. C. Koshy, W. H. (ed.), *Hepatitis B virus: Molecular mechanisms in disease and novel strategies for therapy*. Imperial College Press, London p. 51–74.
- Schubert, U; Antón, LC; Gibbs, J; Norbury, CC; Yewdell, JW; Bennink, JR (2000b). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404: 770–774.
- Schubert, U; Ott, DE; Chertova, EN; Welker, R; Tessmer, U; Princiotta, MF; Bennink, JR; Kräusslich, H-G; Yewdell, JW (2000a). Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13057–13062.
- Schwartz, AL; Ciechanover, A (1999). The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50: 57–74.
- Sells, MA; Chen, ML; Acs, G (1987). Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1005–1009.
- Strack, B; Calistri, A; Accola, MA; Palu, G; Göttlinger, HG (2000). A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13063–13068.
- Sugawara, K; Hatori, M; Nishiyama, Y; Tomita, K; Kamel, H; Konishi, M; Oki, T (1990). Eponemycin, a new antibiotic active against B16 melanoma. I. Production, isolation, structure and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 43: 8–18.

- Sunyach, C; Rollier, C; Robaczewska, M; Borel, C; Barraud, L; Kay, A; Trepo, C; Will, H; Cova, L (1999). Residues critical for duck hepatitis B virus neutralization are involved in host cell interaction. *J. Virol.* 73: 2569–2575.
5
Suzuki, R; Tamura, K; Li, J; Ishii, K; Matsuura, Y; Miyamura, T; Suzuki, T (2001). Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 280: 301–309.
Teicher, BA; Ara, G; Herbst, R; Palombella, VJ; Adams, J (1999). The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 5: 2638–2645.
Thanos, D; Maniatis, T (1995). NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80: 529–532.
10
Torresi, J; Locarnini, S (2000). Antiviral chemotherapy for the treatment of hepatitis B virus infections. *Gastroenterology* 118(2 Suppl 1): S83–103.
Trautwein, C; Manns, M (2001). Antivirale Therapie der chronischen Virushepatitis. *Internist* 42: 913–923.
Voges, D; Zwickl, P; Baumeister, W (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 1015–1068.
20
Yagi, T; Hardin, JA; Valenzuela, YM; Miyoshi, H; Gores, GJ; Nyberg, SL (2001). Caspase inhibition reduces apoptotic death of cryopreserved porcine hepatocytes. *Hepatology* 33: 1432–40.
Zhang, Z; Torii, N; Furusaka, A; Malayaman, N; Hu, Z; Liang, TJ (2000). Structural and functional characterization of interaction between Hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J. Biol. Chem.* 275: 15157–15165.
25
30

Patentansprüche

1. Mittel zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitisviren, dadurch gekennzeichnet, dass sie als wirksame Komponente mindestens einen Proteasom-Inhibitor in einer pharmazeutischen Zubereitung enthalten.
35
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, welche die Aktivitäten des Ubiquitin/Proteasom-Pathway hemmen, regulieren oder anderweitig beeinflussen.
40
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die speziell die enzymatischen Aktivitäten des kompletten 26S Proteasom-Komplexes und des freien, nicht mit regulatorischen Untereinheiten assoziierten 20S katalytisch aktiven Proteasom-Komplexes beeinflussen.
45
4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die als Proteasom-Inhibitoren von Zellen höherer Eukaryoten aufgenommen werden und nach Zellaufnahme mit den katalytischen Untereinheiten des Proteasoms in Wechselwirkung treten und dabei alle oder einzelne proteolytische Aktivitäten des Proteasoms – die Trypsin-, die Chymotrypsin- und die Post-glutamyl-Peptid hydrolysierenden Aktivitäten – innerhalb des 26S oder auch des 20S Proteasomkomplexes blockieren.
55
5. Mittel nach Anspruch 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutischen Zubereitungen neben Proteasom-Inhibitoren auch andere Mittel enthalten, welche das zelluläre Ubiquitin-System beeinflussen, regulieren oder hemmen, wie die Aktivitäten
60
 - 5.1. der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme und/oder
 - 5.2. der Ubiquitin-hydrolysierenden Enzyme.

6. Mittel nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die in verschiedenen Formen in vivo oral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder in verkapselter Form mit oder ohne Zell-Spezifität-tragende Veränderungen verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmtes Applikations- und/oder Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relative hohe metabolische Halbwertszeit und eine relative geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.
7. Mittel nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die
 - a) in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden oder
 - b) durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen oder
 - c) total-synthetisch hergestellt werden.
 - d) durch gentherapeutische Verfahren in vivo synthetisiert werden.
8. Mittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die folgenden Substanzklassen angehören:
 - a) natürlich vorkommende Proteasom-Inhibitoren:
Peptid-Derivate, welche C-terminal Epoxyketon-Strukturen enthalten
β-Lacton-Derivate
Aclacinomycin A (auch bezeichnet als Aclarubicin),
Lactacystin und dessen chemische modifizierte Varianten, wie der Zellmembranpenetrierenden Variante "Clastolactacystein β-Lacton"
 - b) synthetisch hergestellte Proteasom-Inhibitoren:
modifizierte Peptidaldehyde wie N-carbobenzoxy-L-leucinyl-L-leucinyl-L-leucinal (auch bezeichnet als MG132 oder zLLL), dessen Borsäure-Derivat MG232; N-Carbobenzoxy-Leu-Leu-Nva-H (bezeichnet als MG115; N-Acetyl-L-Leuzinyl-L-Leuzinyl-L-Norleuzinal (bezeichnet als LLnL), N-Carbobenzoxy-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H (auch bezeichnet als PSI);
c) Peptide, welche C-terminal eine α,β-Epoxyketon-Struktur tragen, ferner Vinylsulfone wie
 - 8.c1. Carbobenzoxy-L-Leucinyl-L-Leucinyl-L-Leucin-vinyl-sulfon oder
 - 8.c2. 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leucinyl-L-Leucinyl-L-Leucin-vinyl-sulfon (NLVS)
 - d) Glyoxal- oder Borsäure-Reste wie
 - 8.d1. Pyrazyl-CONH(CHPhe)CONH(CHisobutyl)B(OH)₂ sowie
 - 8.d2. Dipeptidyl-Borsäure-Derivate oder
 - e) Pinacol-Ester – wie Benzyloxycarbonyl(Cbz)-Leu-Leu-boroLeu-Pinacol-Ester.
9. Mittel nach Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass als besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren die Epoxyketone
 - 9.1. Epoxomicin (Epoxomycin, Molekülformel: C₂₈H₈₆N₄O₇) und/oder
 - 9.2. Eponemicin (Eponemycin, Molekülformel: C₂₀H₃₆N₂O₅)
eingesetzt werden.
10. Mittel nach Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass als besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren aus der PS-Serie die Verbindungen

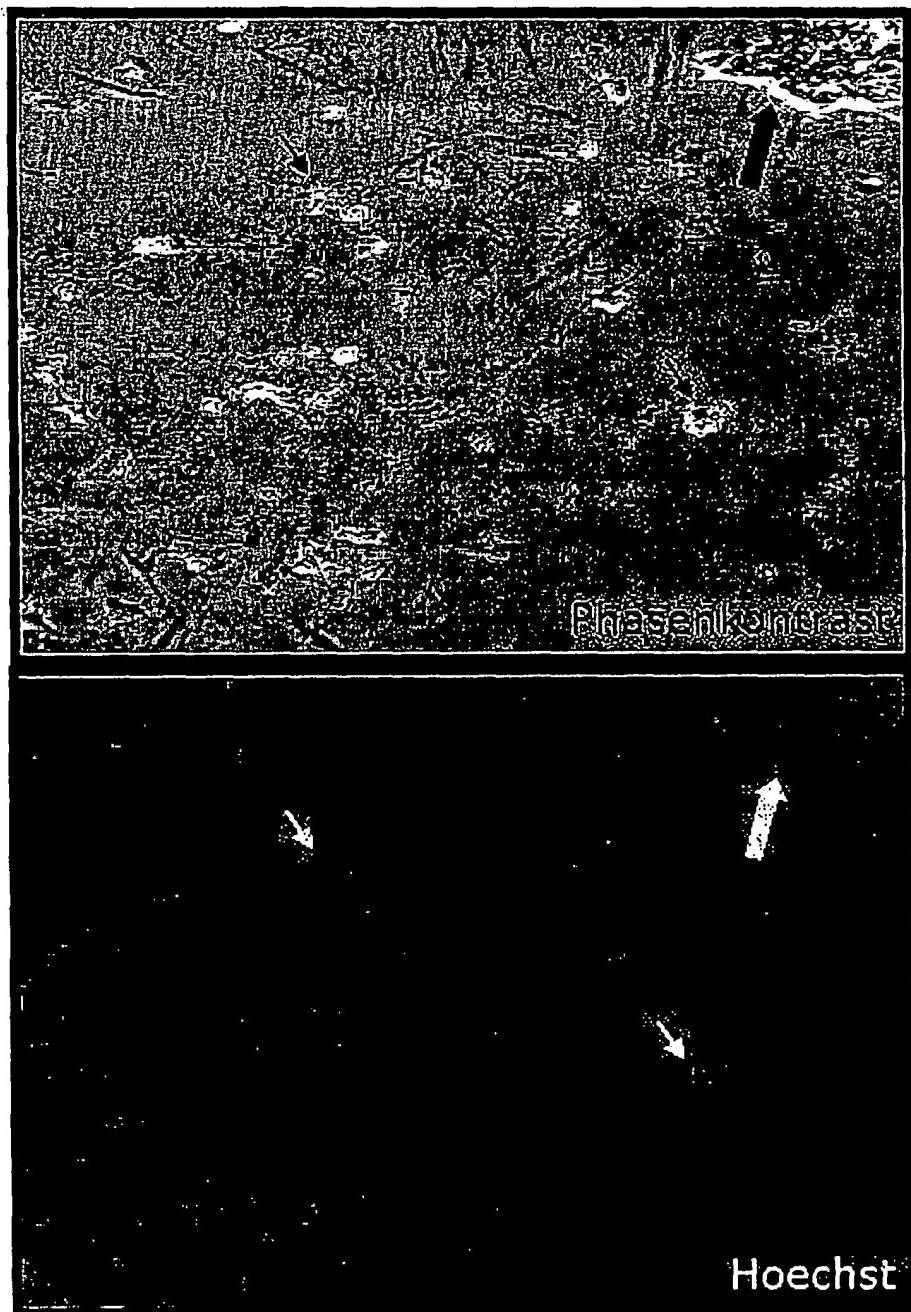
- 10.1. PS-519 als β -Lacton- sowie als Lactacystin-Derivat die Verbindung 1R-[15, 4R, 5S]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0] heptane-3,7-dione – Molekülformel C₁₂H₁₉NO₄ – und/oder
10.2. PS-314 als Peptidyl-Borsäure-Derivat die Verbindung N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-Leuzin-Borsäure – Molekülformel C₁₉H₂₅BN₄O₄ – und/oder
10.3. PS-273 (Morpholin-COCONH-(CH-Naphthalen)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und dessen Enantiomer PS-293 und/oder
10.4. die Verbindung PS-296 (8-Quinolyl-sulfonyl-COCONH-(CH-Naphthalen)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
10.5. PS-303 (NH₂(CH-Naphthalen)-COCONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
10.6. PS-321 als (Morpholin-COCONH-(CH-Naphthalen)-CONH-(CH-Phenylalanin)-B(OH)₂); und/oder
10.7. PS-334 (CH₃-NH-(CH-Naphthalen)-COCONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
10.8. die Verbindung PS-325 (2-Quinol-COCONH-(CH-homo-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
10.9. PS-352 (Phenylalanin-CH₂-CH₂-COCONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
10.10. PS-383 (Pyridyl-COCONH-(CHpF-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂)
eingesetzt werden.
11. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren der Ansprüche 1 bis 10 zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitisviren.
12. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Hemmung von späten Prozessen im Replikationszyklus von Hepatitis-Viren.
13. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Proteasom-Inhibitoren die Produktion von infektiösen Virionen von Hepatitisvirus-infizierten Zellen weitgehend oder vollkommen durch Blockierung unterbinden.
14. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Proteasom-Inhibitoren die Hemmung der Freisetzung von Virionen wie auch eine nahezu vollständige Reduktion der Infektiosität der freigesetzten Virionen bewirken.
15. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Proteasom-Inhibitoren die Virusvermehrung und somit die Neuinfektion von Hepatozyten und damit die Ausbreitung einer Hepatitis-Infektion *in vivo* in dem Lebergewebe eines Infizierten unterdrücken.
16. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Hemmung der Vermehrung von Hepadnaviren nach den Mechanismen
a) Blockierung/Reduktion der Freisetzung von neuen Virionen
b) Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Virionen
c) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in Kulturen von primären Hepatozyten
d) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in der Leber *in vivo*.
17. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Induktion des Absterbens von Hepatokarzinomzellen.
18. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 17 zur Unterdrückung und/oder Verhinderung

- des Entstehens von Leberzell-Karzinomen.
19. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 17 und 18 zur Therapie von Patienten mit etablierten Leberzellkarzinomen.
20. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 17 bis 19 zur Behandlung/Bekämpfung/Verhinderung von
20.1. HBV-induzierter Leberzirrhose und/oder
20.2. HBV-induzierten Leberzellkarzinomen.
20.3. HCV-induzierten Leberkarzinomen
20.4. Medikamenten-induzierten Leberkarzinomen
20.5. genetisch bedingten Leberkarzinomen
20.6. durch Umweltbedingte Leberkarzinome.
21. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 17 bis 20 zur gezielten Eliminierung von Leberkarzinomzellen, welche infolge einer
21.1. HBV-Infektion und/oder
21.2. HCV-Infektion oder
21.3. entsprechenden Koinfektion mit beiden Viren oder
21.4. HDV/HBV-Koinfektion entstehen.
22. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 17 bis 21 zur Verhinderung der Entstehung, des Wachstums und der Metastasierung von Leberzelltumoren sowie zur bevorzugten Zerstörung von Leberkarzinomzellen in HBV- und HCV-infizierten Patienten und Tieren.
23. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Modulation der Expression, Modifizierung und Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53.
24. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Leberzellregeneration bei Patienten mit Leberentzündung.
25. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Reduktion der Anzahl infizierter Virusproduzierender Zellen im Leberzellgewebe.
26. Verwendung nach Anspruch 11–14, dadurch gekennzeichnet, dass Proteasom-Inhibitoren die Phosphorylierung von Hepatitis-Viren Core-Proteinen verändern und dadurch die Freisetzung und Infektiosität von Hepatitis-B-Viren herabsetzen oder blockieren.
27. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Hemmung sowohl der Erhaltung und Persistenz einer bereits etablierten Infektion als auch einer Sekundärinfektion und somit der Ausbreitung einer Infektion, einschließlich der Blockierung der Ausbreitung einer HBV-Infektion *in vivo*.
28. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 7 bis 11 in Kombination untereinander zur Behandlung und Bekämpfung von Hepatitiden.
29. Verwendung nach Anspruch 28 in Kombination mit bereits in der anti-viralen Therapie von Hepadnaviren verwendeten Therapeutika.
30. Verwendung nach Anspruch 28 und 29 zur Behandlung von Koinfektionen mit HBV und Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2.
31. Verwendung nach Anspruch 30 zur Behandlung von HBV/HIV-Koinfektionen in Kombination mit der HAART-Therapie.
32. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Verhinderung einer Re-Infektion mit HBV bei Leber- und anderen Organtransplantationen.
33. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Verhinderung einer Re-Infektion mit HBV bei Zelltherapien durch Gabe der Mittel vor, während und nach der Transplantation.

34. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Verhinderung einer Re-Infektion mit HBV bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die immer Restvirus haben und sich neue Organe infizieren können wie auch bei der Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten. 5
35. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Verhinderung der Etablierung einer systemischen Hepatitis-Virus-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus. 10
36. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Vorbeugung einer Hepatitisvirusinfektion bei Personen mit hohem Risiko einer Neuinfektion, wie bei Ärzten, Risiko-Personal in Häusern mit hohem Besucherverkehr, Drogenabhängigen, Reisenden in hochendemische Gebiete für Hepatitisviren, in der Krankenbehandlung oder für Familienangehörige von chronischen Virusträgern. 15
37. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Minderung oder Eliminierung einer Leberentzündung durch Immunsystemvermittelte Mechanismen. 20
38. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 7 bis 11 zur Herstellung von Mitteln und/oder pharmazeutischen Zubereitungen zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitisviren. 25
39. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 38 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von Hepatitiden. 30

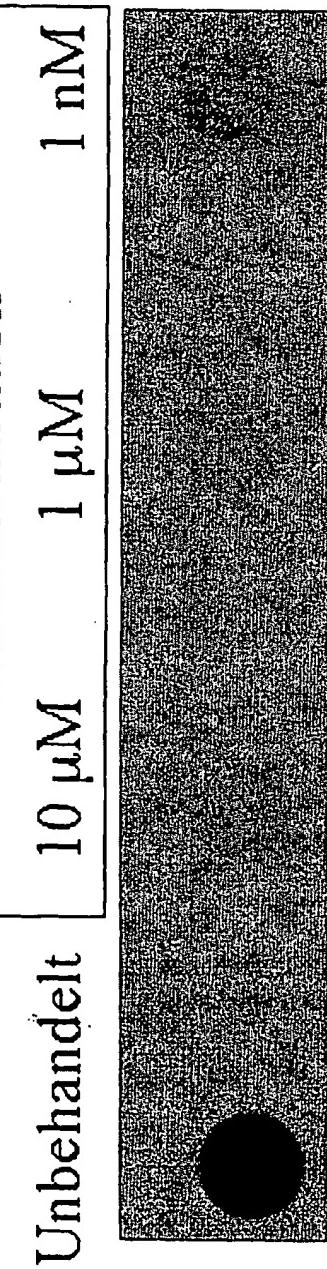
Hierzu 21 Seite(n) Zeichnungen

Figur 1



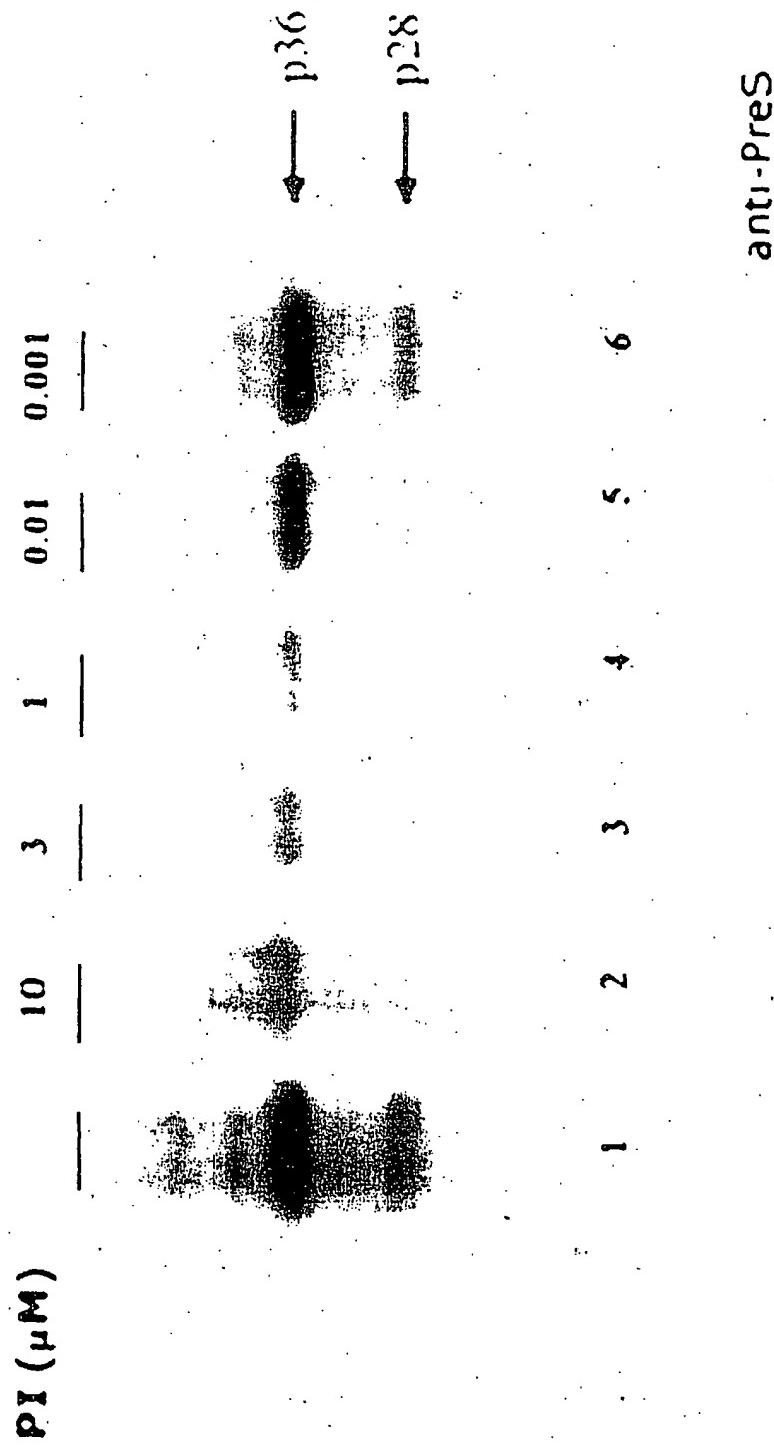
Hoechst

Figur 2



anti-PreS

Figur 3



Figur 4

PI Behandlung

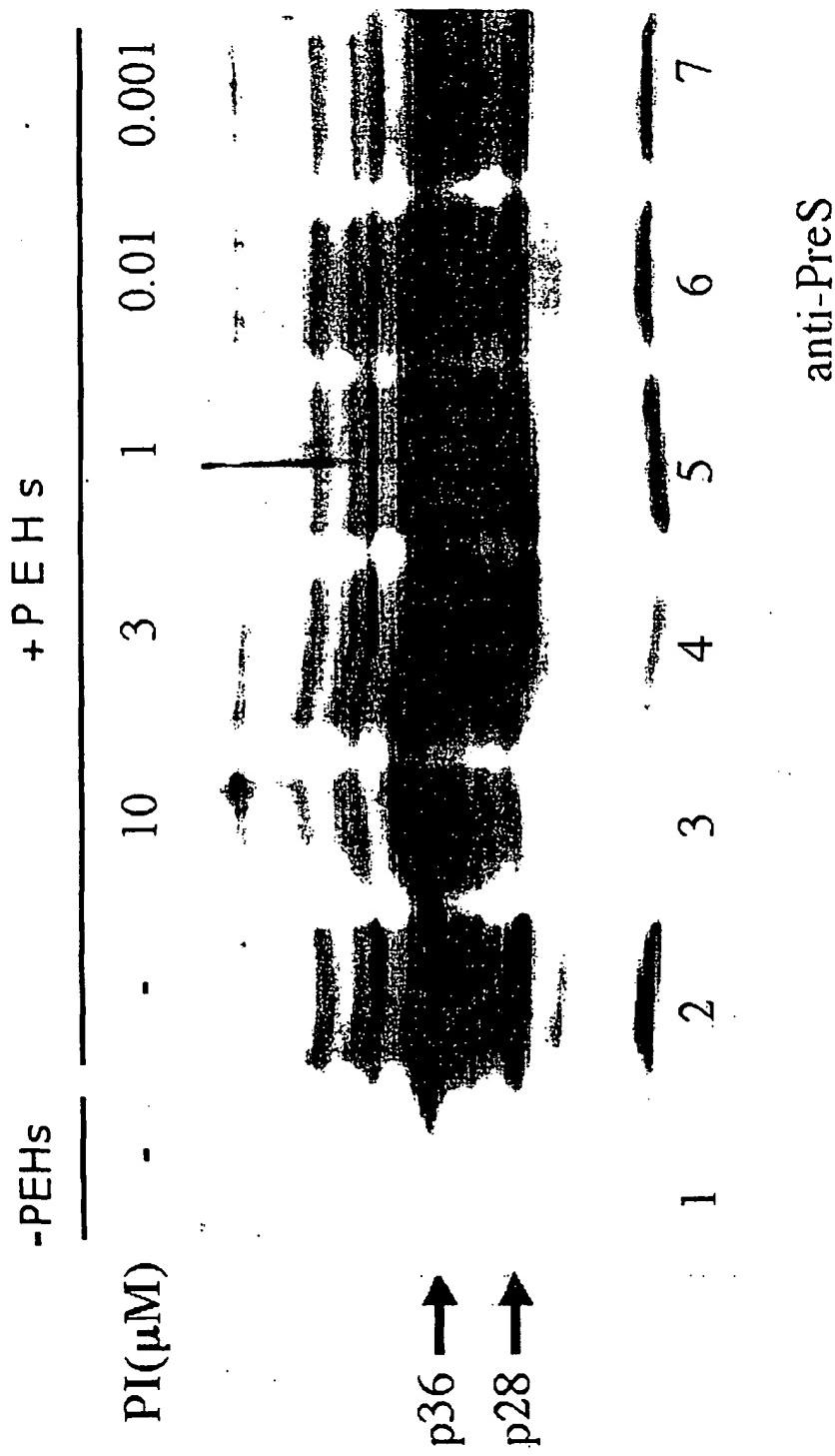
PI	1µM	10µM	0
		-	

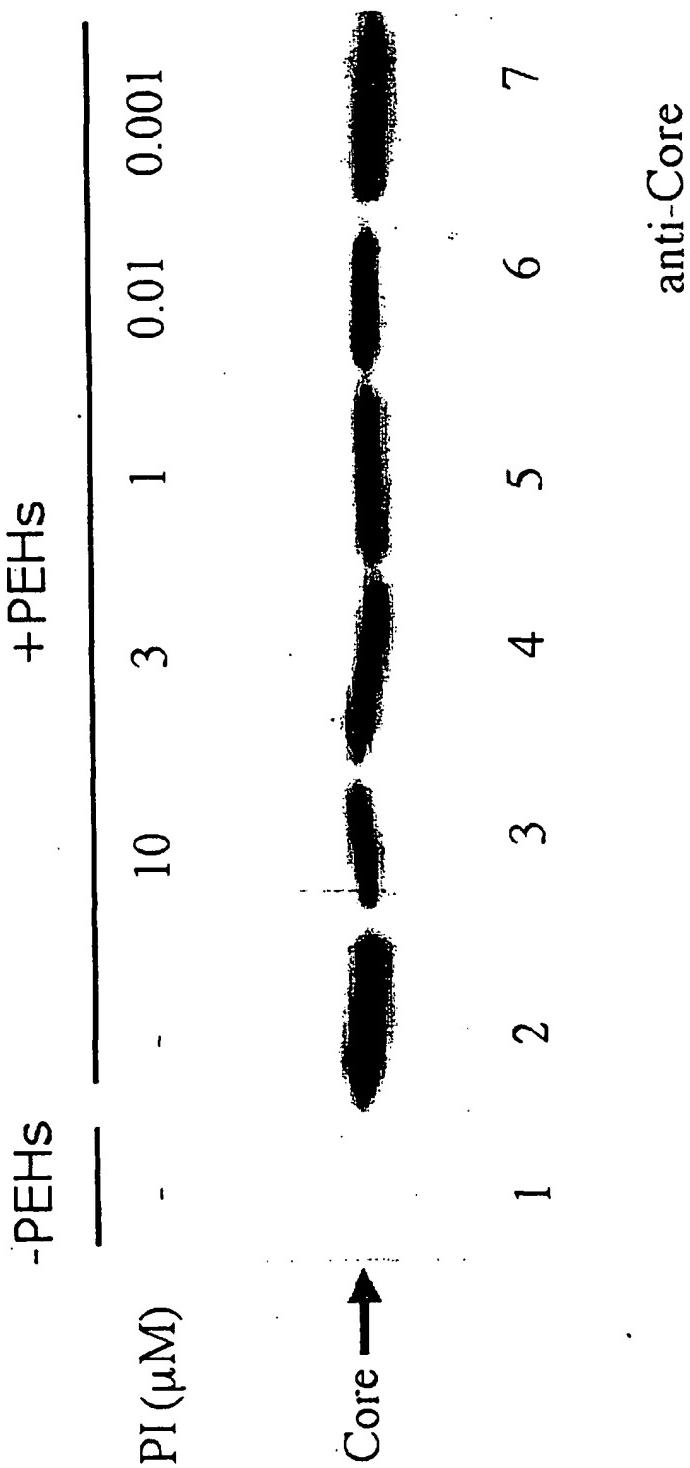
PI	4 pg	2 pg	1 pg	0,5 pg	0,25 pg	0,125 pg

DHBV- DNA Standard

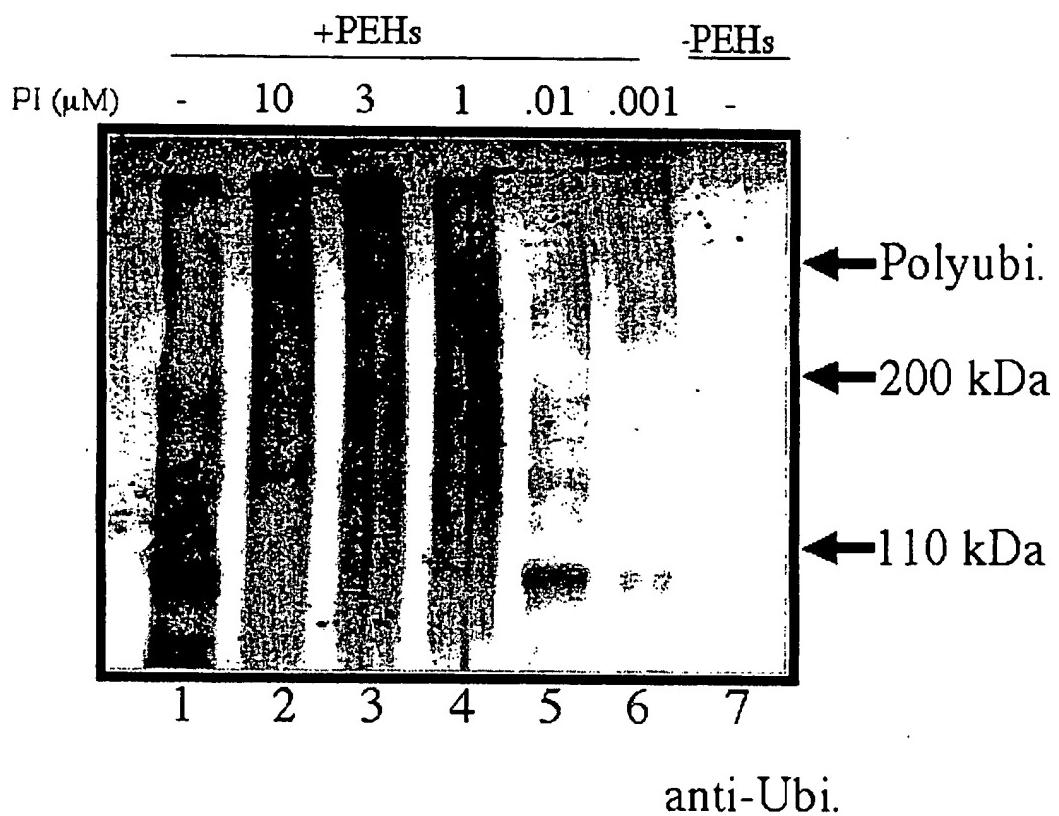
4 pg	2 pg	1 pg	0,5 pg	0,25 pg	0,125 pg

Figur 5



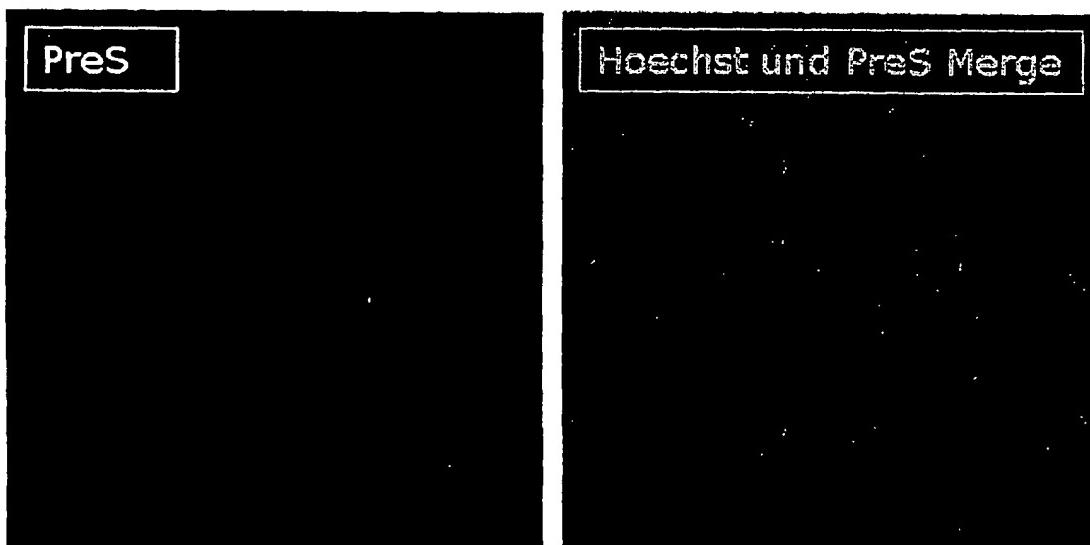
Figur 6

Figur 7

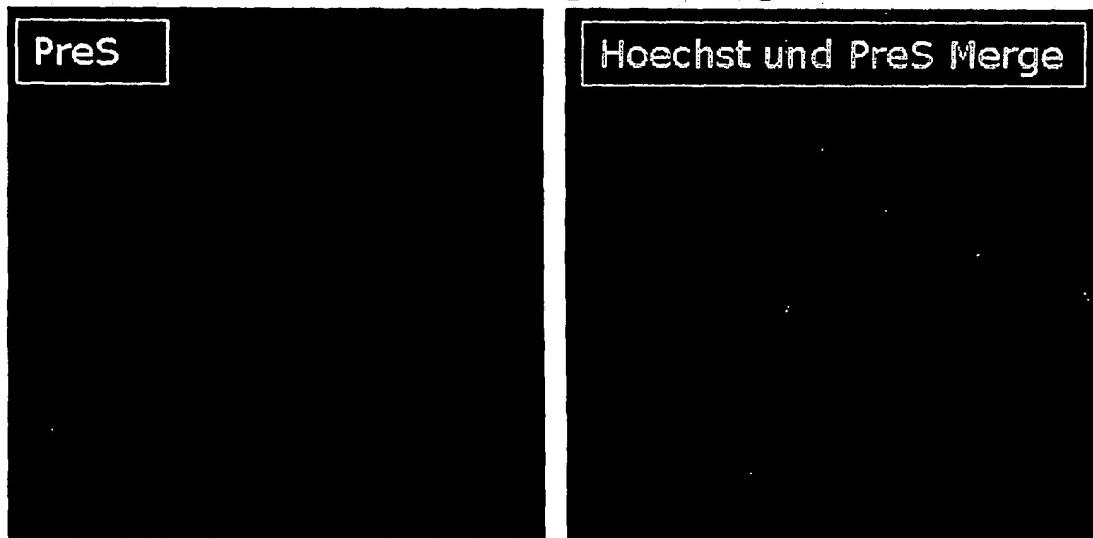


Figur 8

Niedrige Vergrößerung



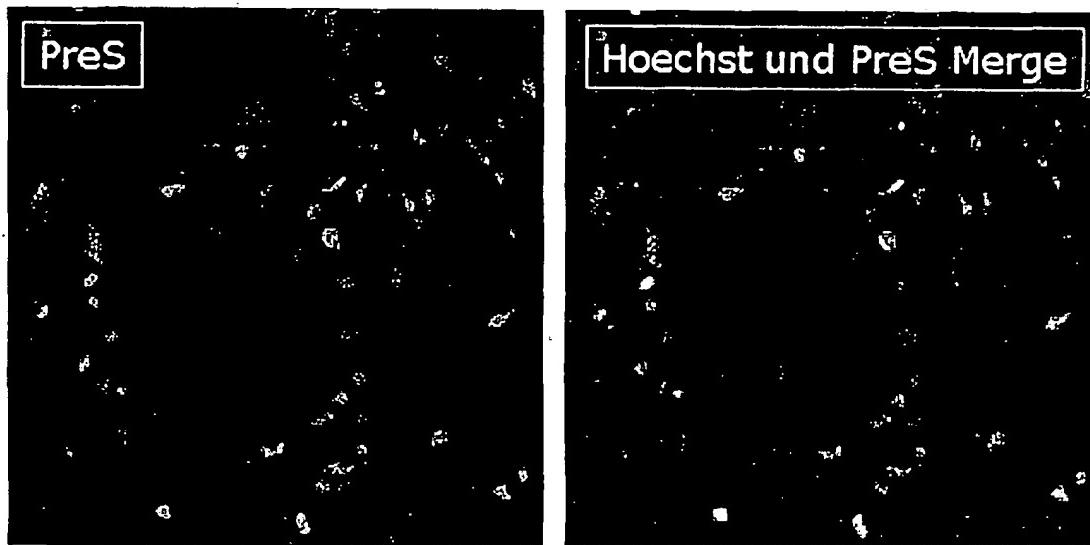
Höhere Vergrößerung



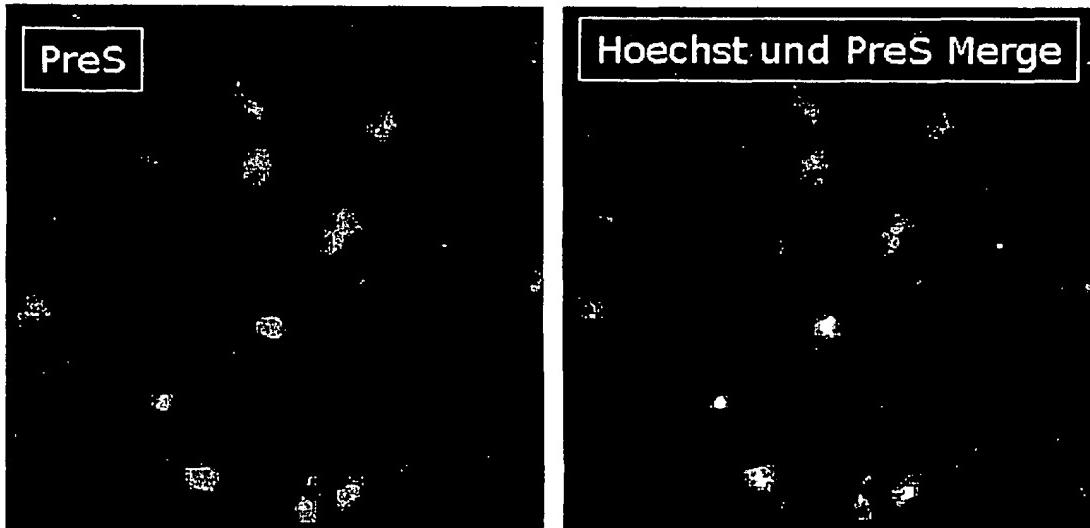
Figur 9

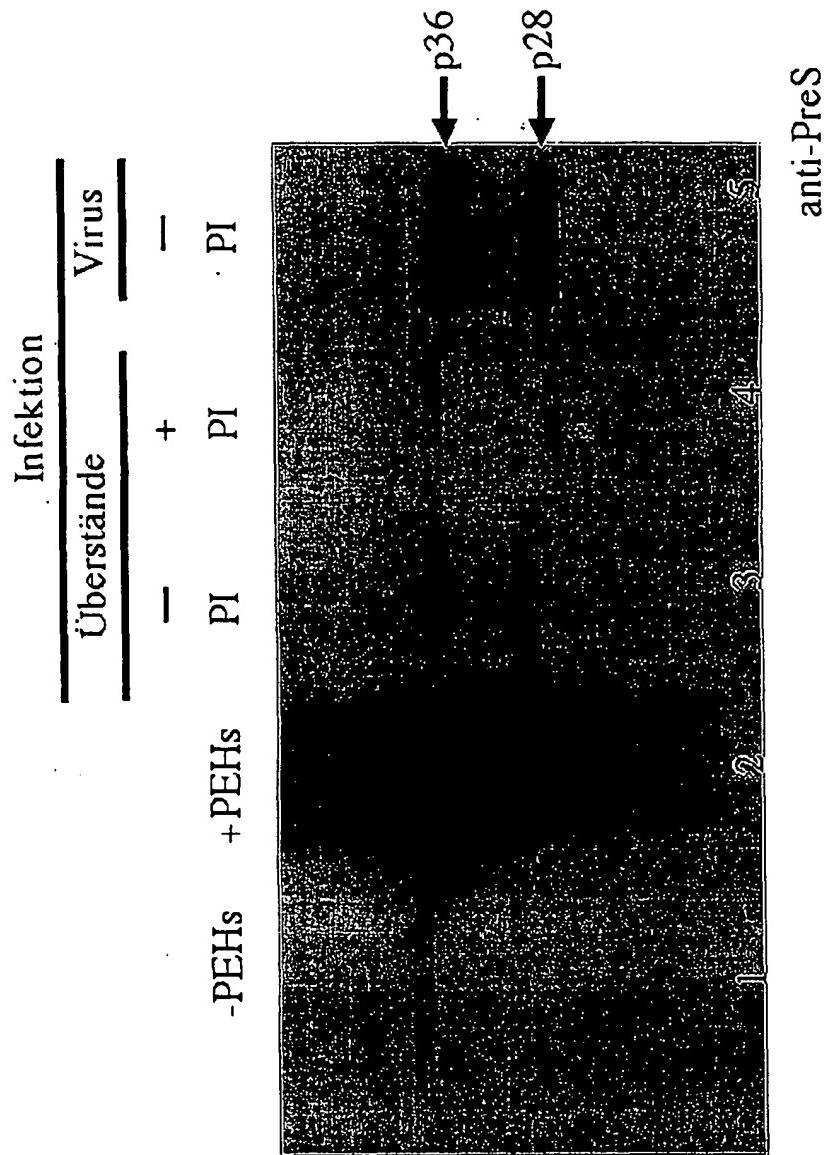
9/21

Niedrige Vergrößerung

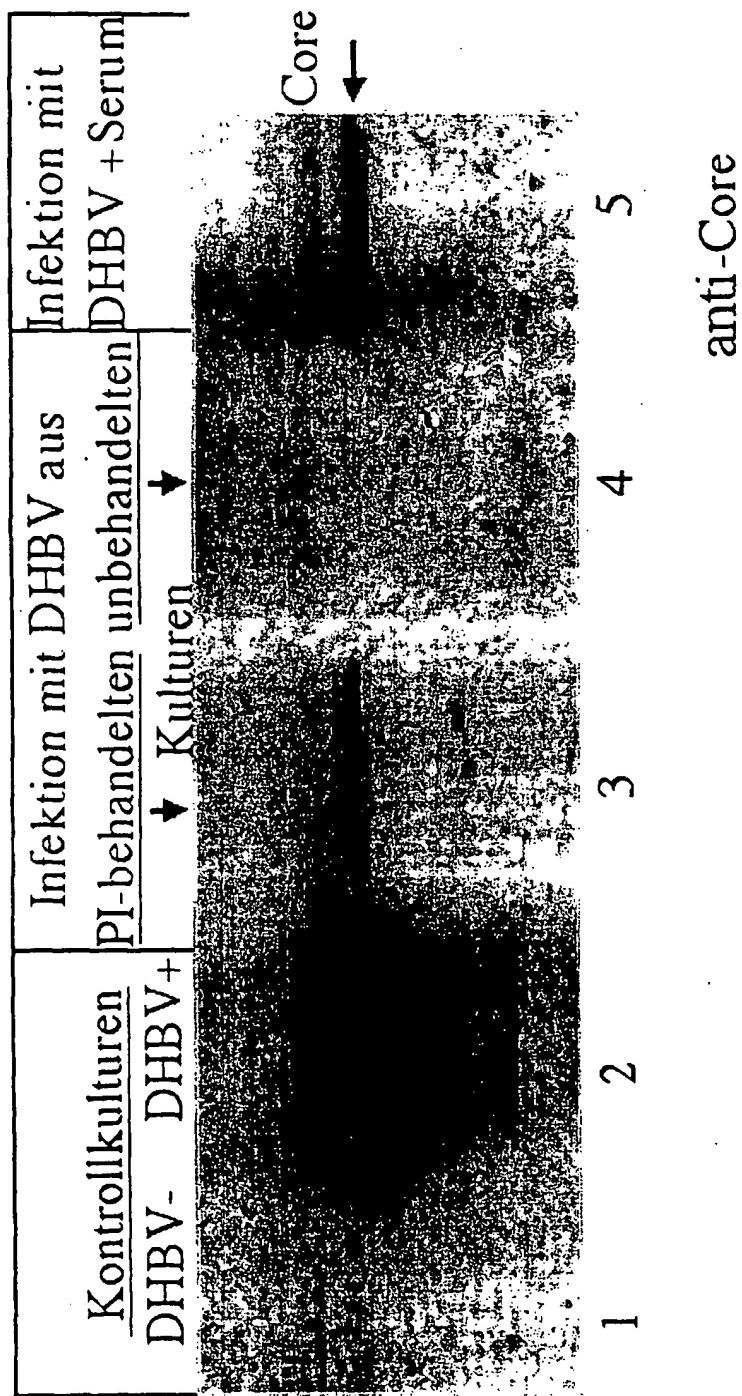


Höhere Vergrößerung

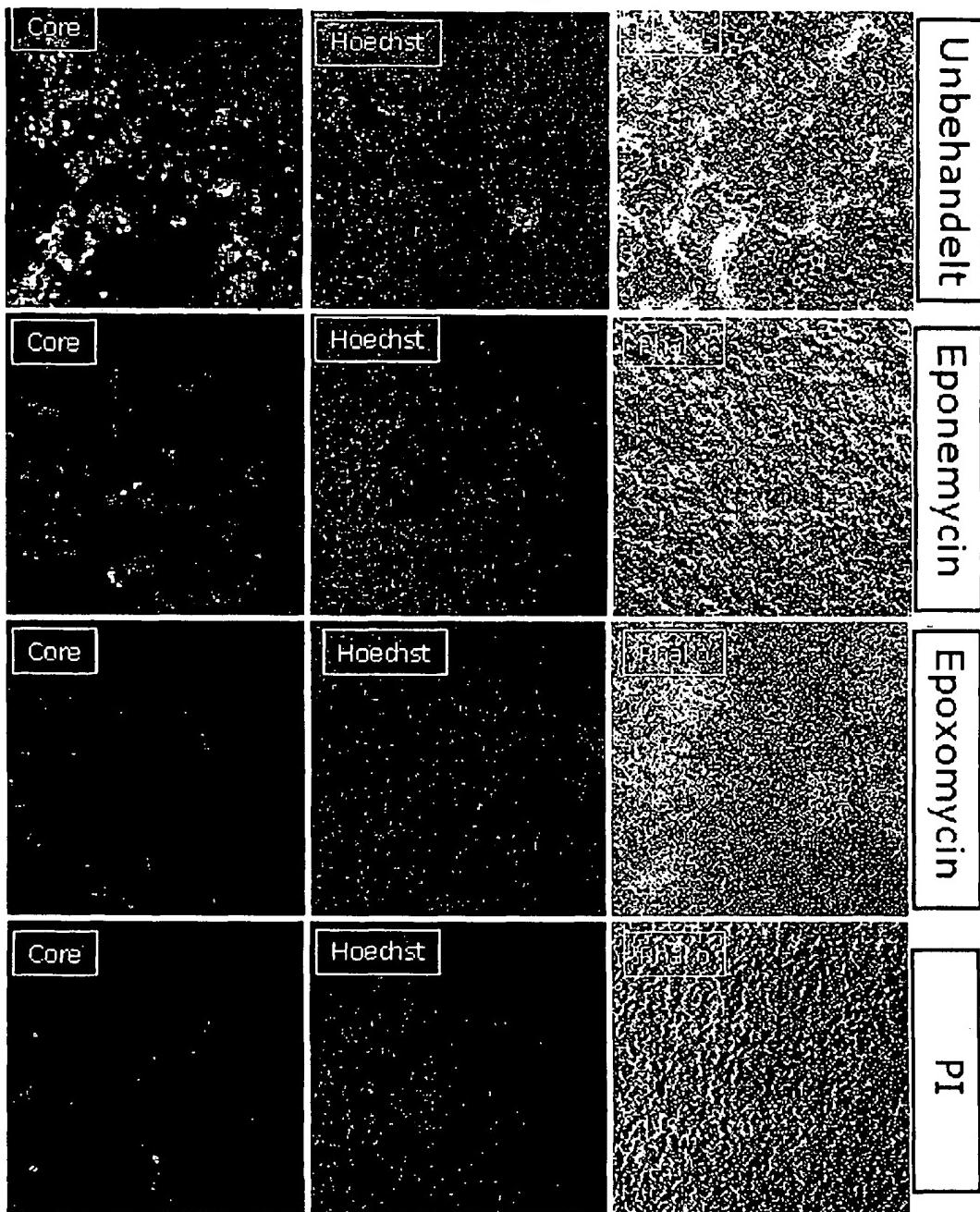


Figur 10

Figur 11

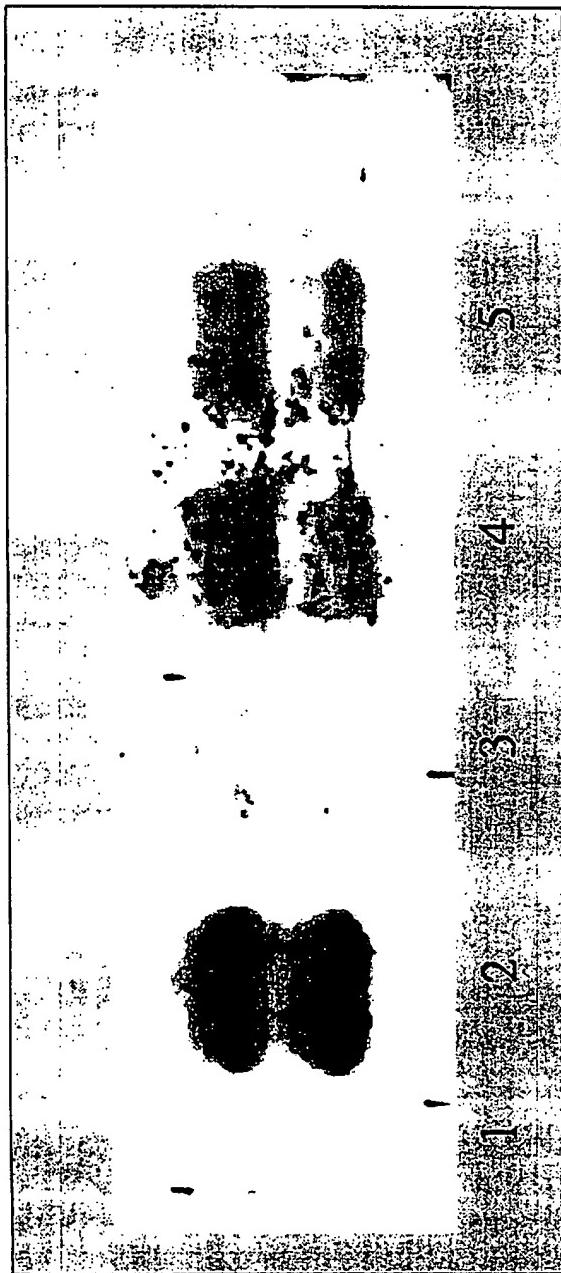


Figur 12



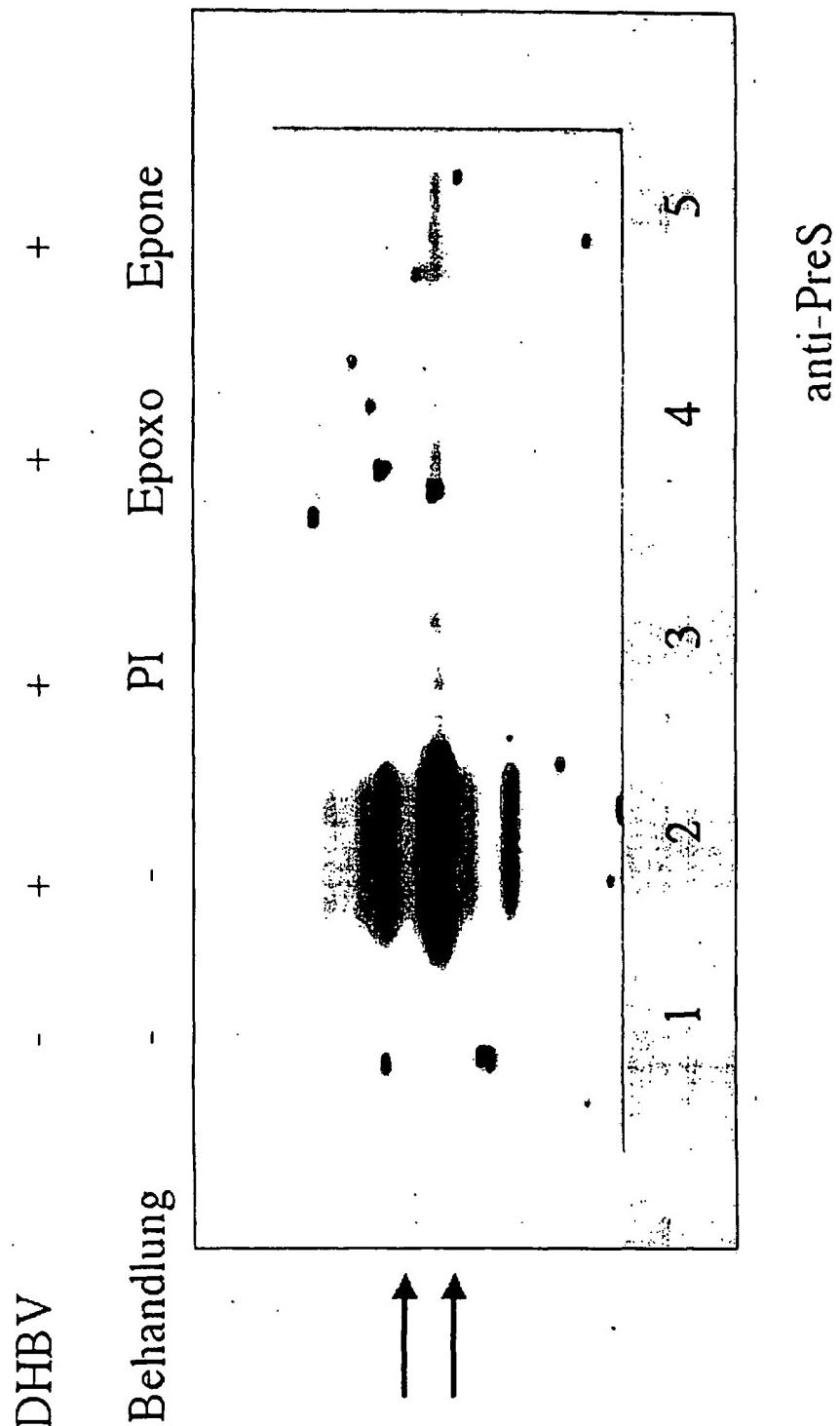
Figur 13

DHBV	-	+	+	+	+
Behandlung	-	-	PI	Epoxo	Epone

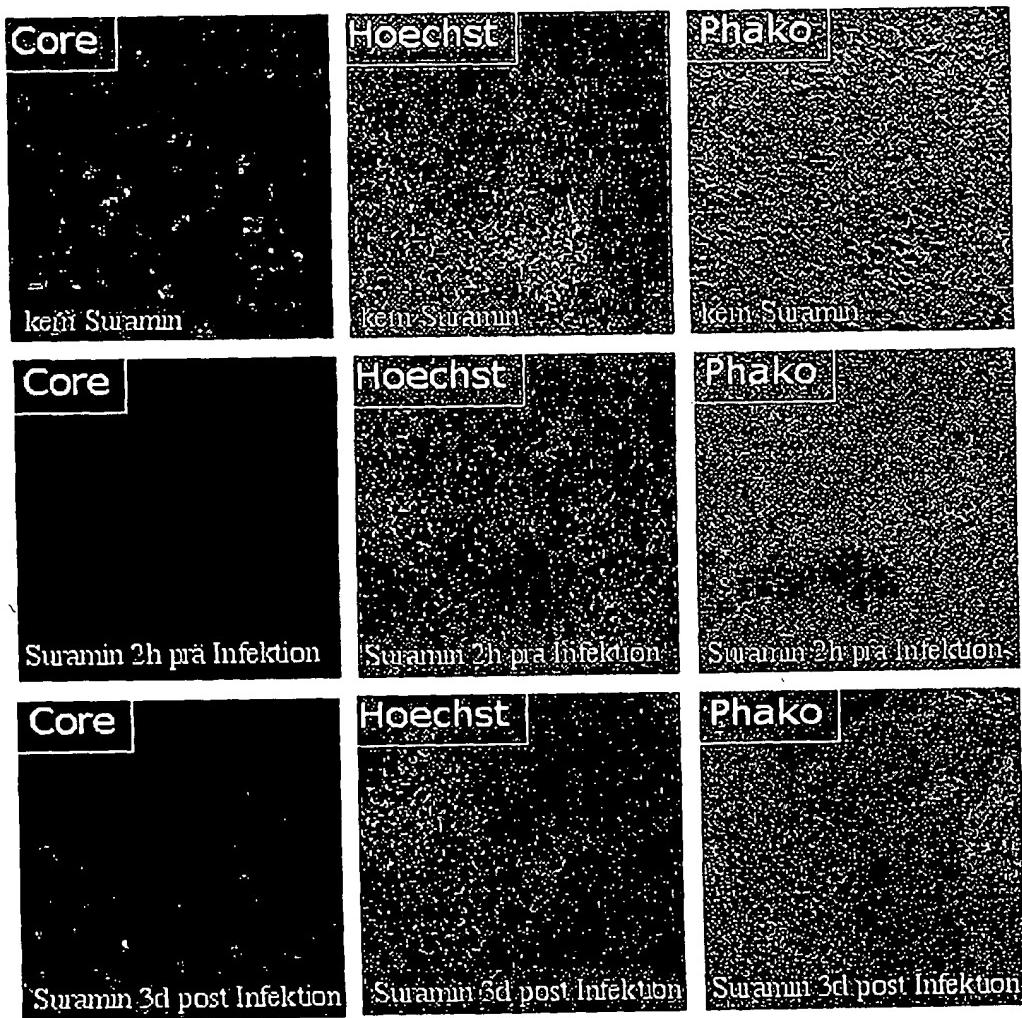


anti-Core

Figur 14

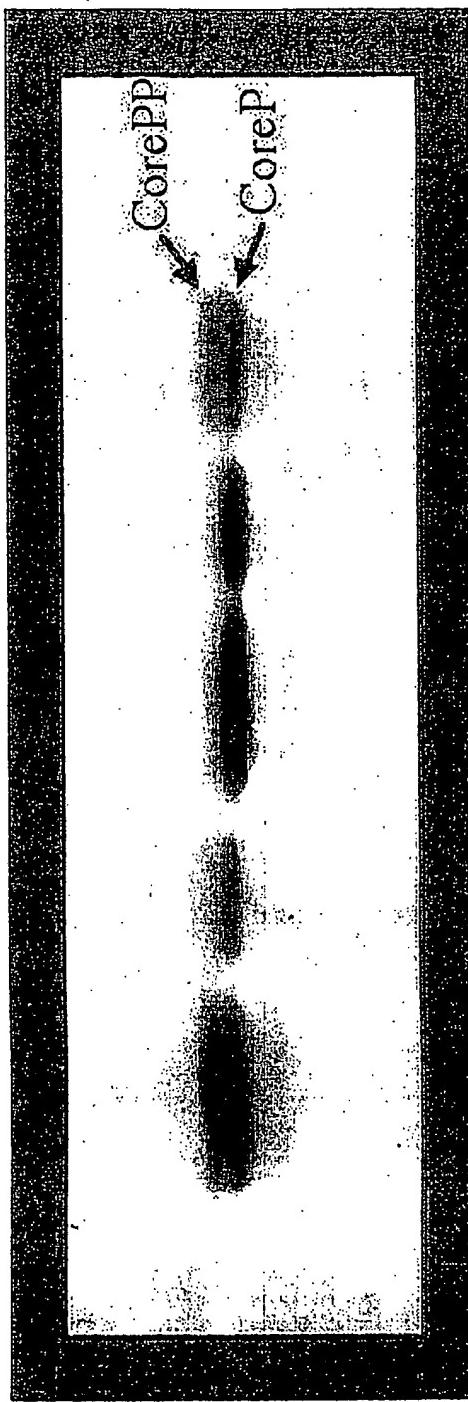


Figur 15



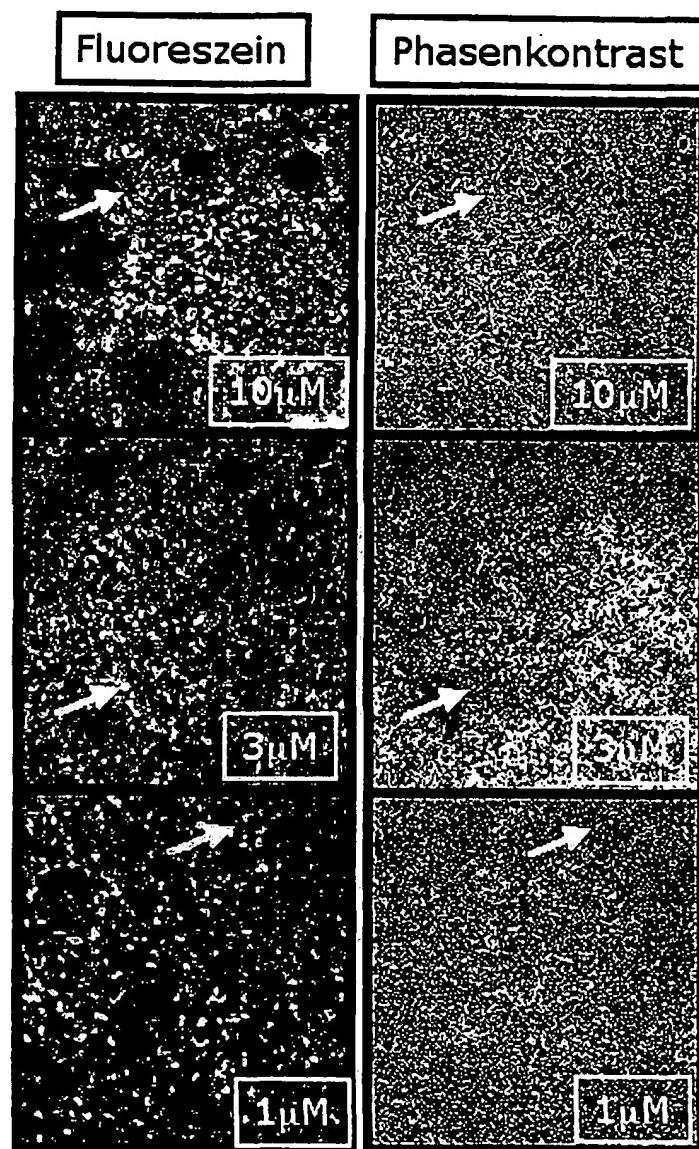
Figur 16

PI(μ M) - - - 10 3 1 0.01

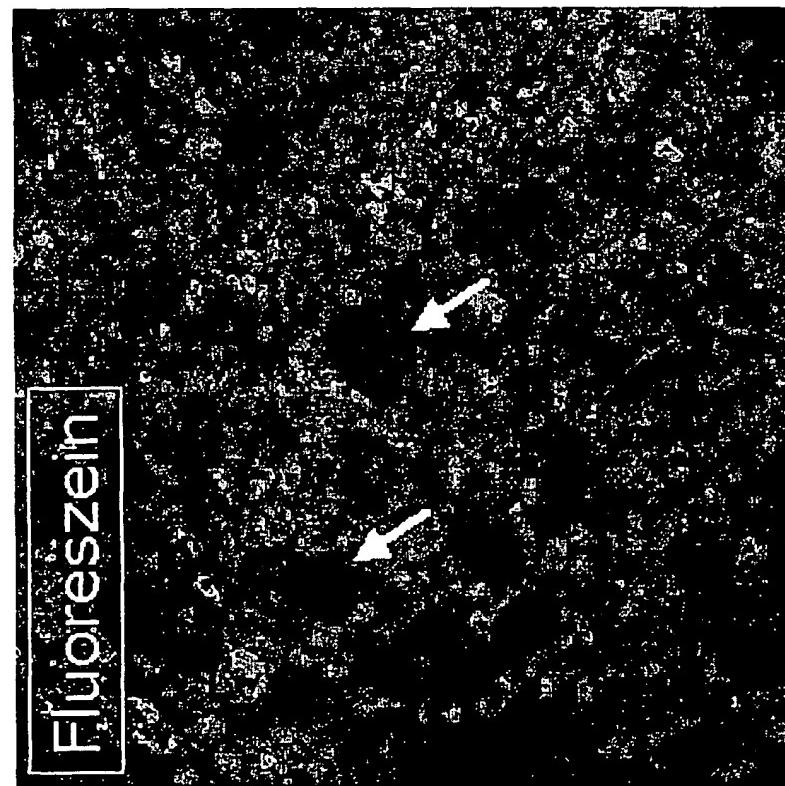
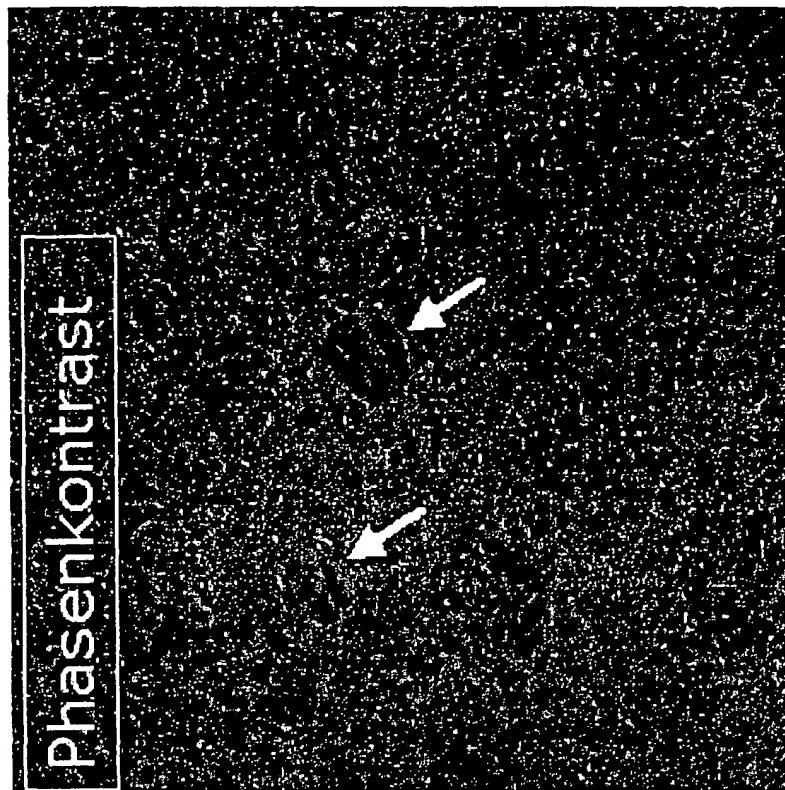


anti-Core

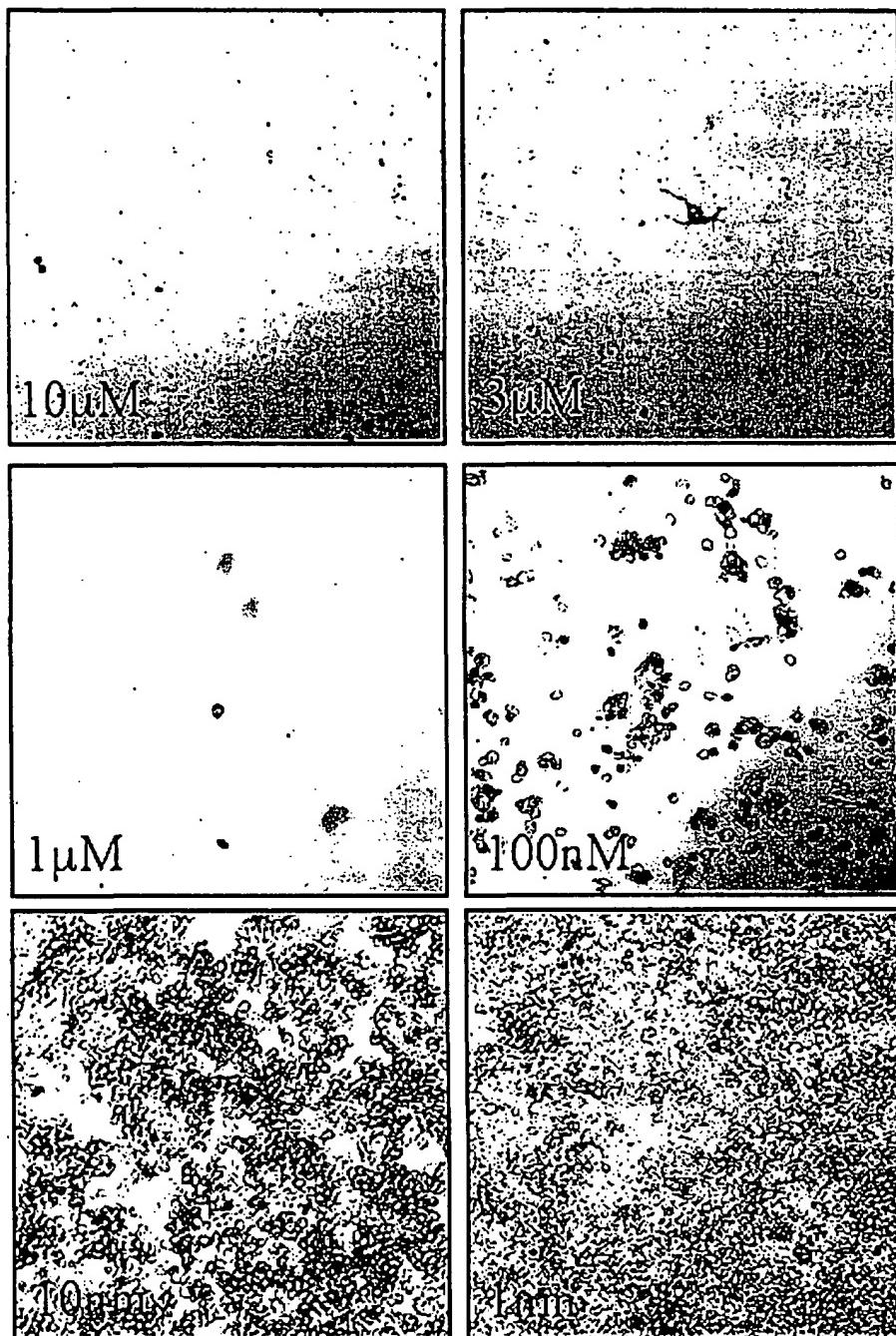
Figur 17



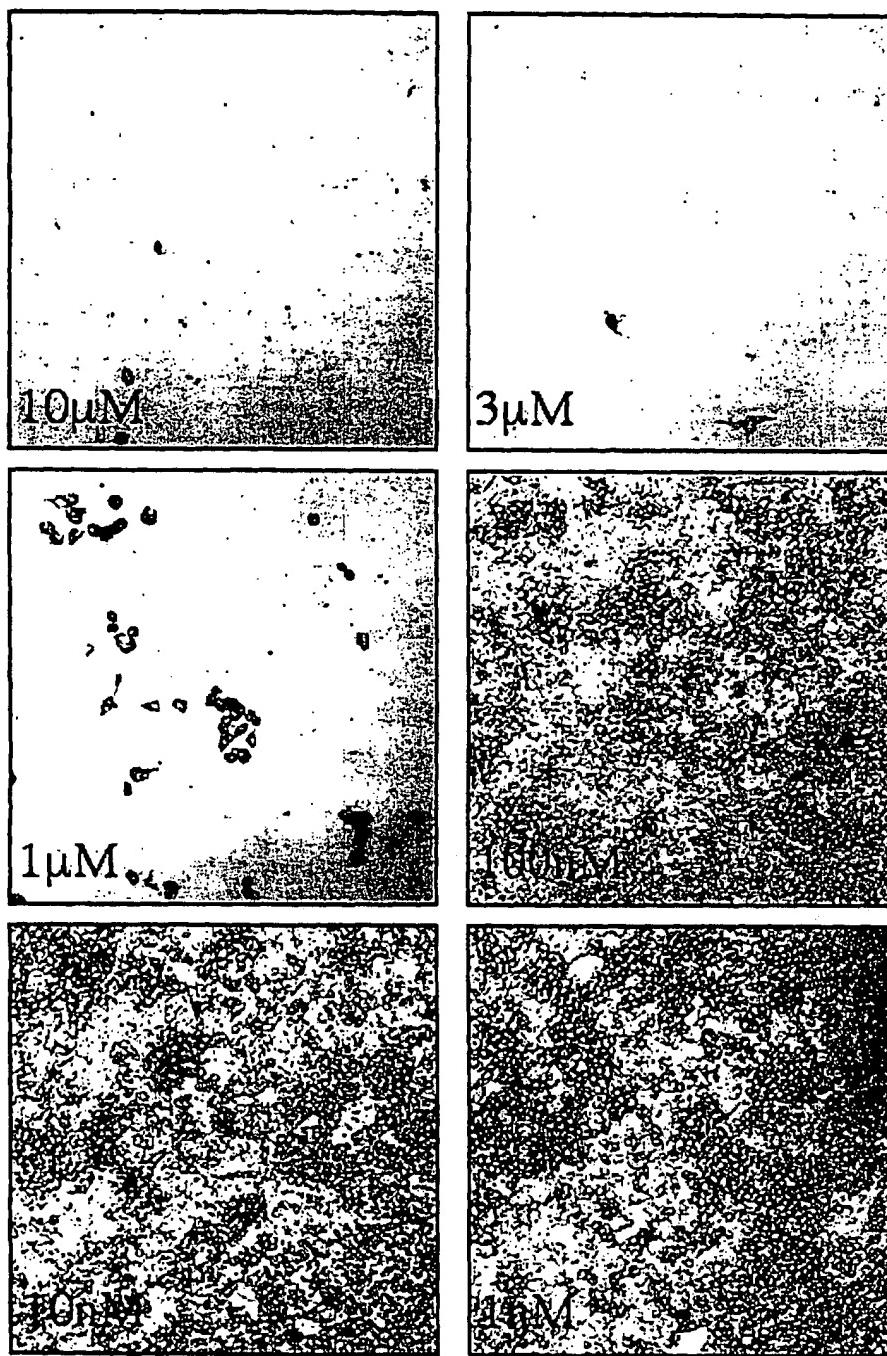
Figur 18



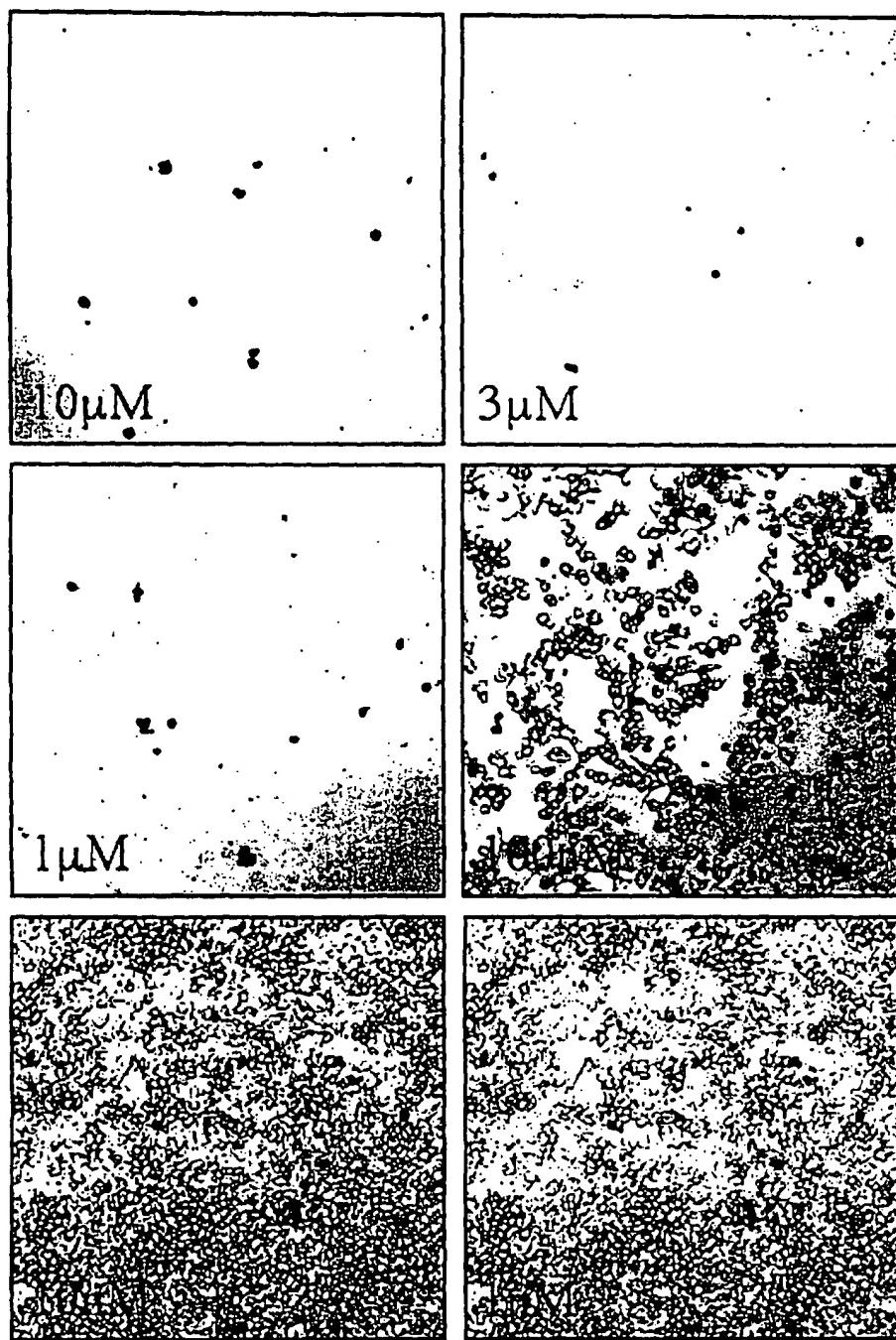
Figur 19



Figur 20



Figur 21



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.